

EXPRESSION DER VERSCHIEDENEN SOMATOSTATIN-REZEPTOREN UND
DES CHEMOKINREZEPTORS CXCR4 IN HEPATOZELLULÄREN UND
CHOLANGIOZELLULÄREN KARZINOMEN

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades**

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von

Robin Schindler

geboren am 19.09.1990 in Dresden

Gutachter

1. Prof. Dr. Amelie Lupp, Jena
2. PD Dr. Daniel Kämmerer, Jena
3. PD Dr. Jan D'Haese, München

Tag der öffentlichen Verteidigung: 17.10.2017

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
AEC	Aminethylcarbazol
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AMD3100	Plerifaxor
BCLC	Barcelona Clinic Liver Cancer
BRISK-PS	Brivanib Study in HCC Patients at Risk Post Sorafenib
CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
cAMP	Cyklisches Adenosinmonophosphat
CCC	Cholangiozelluläres Karzinom
CD	Cluster of Differentiation
CLIP	Cancer of the Liver Italian Program
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
CUPI	Chinese-University-Prognostic-Index
DAG	Diacylglycerin
dCCA	Distales cholangiozelluläres Karzinom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
DPTA	Diethylentriaminpentaessigsäure
ELR	Glutamyl-Leucyl-Arginin-Motiv
ERCP	Endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie
EUS	Endoskopischer Ultraschall
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FNH	Fokale noduläre Hyperplasie
GDP	Guanosindiphosphat
GH	Growth Hormone
GIP	Gastric inhibitory polypeptide
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
GTP	Guanosintriphosphat
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus

HIF-1 α	Hypoxia-inducible factor-1 α
HIFU	Hochintensiver fokussierter Ultraschall
iCCA	Intrahepatisches cholangiozelluläres Karzinom
IHC	Immunhistochemie
INR	International Normalized Ratio
IP ₃	Inositoltriphosphat
IRS	Immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner
JIS	Japan-Integrated-System
LTX	Lebertransplantation
Mac-2BP	MAC-2 binding protein
MIF	Macrophage migration inhibitory factor
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie
mRNA	Messenger RNA (Ribonukleinsäure)
MRT/MRI	Magnetresonanztomographie
MSKCC	Memorial Sloan Kettering Cancer Center
MWA	Mikrowellenablation
NASH	Nichtalkoholische Steatohepatitis
OLC	Orthotope Lebertransplantation
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
pCCA	Perihiläres cholangiozelluläres Karzinom
PEI	Perkutane Ethanolinjektion
PET	Positronenemissionstomographie
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PRRT	Peptidrezeptor-vermittelte Radionuklidtherapie
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
PTT	Partielle Thromboplastinzeit
RFA	Radiofrequenzablation
RSA	Rinderserumalbumin
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SBRT	Stereotaktische Bestrahlung
SDF-1	Stromal cell-derived factor-1
SHARP	Study-of-Heart-And-Renal-Protection
SIRT	Selektive Interne Radiotherapie

SSA	Somatostatinanalogon/a
SST	Somatostatin
SSTR	Somatostatin-Rezeptor(en)
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TGF- β	Transforming growth factor- β
TSH	Thyreoid-stimulating Hormone
Tumor-M2-PK	Pyruvatkinase M2
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VIP	Vasoactive intestinal peptide
Y90	Yttrium-90

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	4
2.1	Das hepatozelluläre Karzinom	4
2.1.1	Definition und Epidemiologie	4
2.1.2	Risikofaktoren und Ätiologie	5
2.1.3	Klinische Überwachung und Diagnostik	6
2.1.4	Klassifizierung	8
2.1.5	Therapieoptionen	10
2.2	Das cholangiozelluläre Karzinom	13
2.2.1	Definition und Epidemiologie	13
2.2.2	Risikofaktoren	14
2.2.3	Klassifikation	15
2.2.4	Diagnostik	16
2.2.5	Therapie	19
2.3	Somatostatin	23
2.3.1	Somatostatin-Rezeptoren	24
2.3.1.1	Signaltransduktion	26
2.3.2	Somatostatinanaloge	28
2.3.2.1	Einsatz von Somatostatinanloga	29
2.3.3	Somatostatin-Rezeptor-Expression in Tumoren	30
2.3.4	Somatostatin-Rezeptor-Expression in hepatozellulären Karzinomen	31
2.3.5	Somatostatin-Rezeptor-Expression in cholangiozellulären Karzinomen	33
2.4	Chemokine	34
2.4.1	Chemokinrezeptoren	35
2.4.1.1	Signaltransduktion	36
2.4.2	CXCR4 und CXCL12	36
2.4.3	CXCR4-Expression in Tumoren	37
2.4.4	CXCR4-Expression in hepatozellulären Karzinomen	38
2.4.5	CXCR4-Expression in cholangiozellulären Karzinomen	39
2.5	Der Proliferationsmarker Ki-67	39
3.	Zielsetzung dieser Arbeit	41

4.	Material und Methodik	43
4.1	Patientendaten und Proben	43
4.1.1	Votum der Ethikkommission	43
4.1.2	Geräte und Materialien zur Probenaufbereitung	43
4.2	Immunhistochemie	43
4.2.1	Materialien und Gerätschaften für die Immunhistochemie	44
4.2.2	Prinzip der Immunhistochemie	47
4.2.3	Durchführung der Immunhistochemie	48
4.2.4	Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung	52
4.2.5	Auswertung der Immunhistochemie	53
4.2.5.1	Lichtmikroskopie	53
4.2.5.2	Immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner	53
4.2.5.3	Proliferationsmarker Ki-67	55
4.2.5.4	Gefäßmarker CD34	56
4.3	Statistik	57
5.	Ergebnisse	58
5.1	Patientendaten	58
5.2	Klinische Daten	59
5.2.1	TNM-Klassifikation	59
5.2.2	Grading	60
5.2.3	Überlebenskurven	61
5.3	Immunhistochemie	64
5.3.1	Ki-67-Expression	64
5.3.2	Somatostatin-Rezeptor-Expression	65
5.3.3	CXCR4-Expression	68
5.3.4	Expressionsmuster	72
5.3.5	Häufigkeitsverteilung	74
5.4	Korrelationen zwischen der SSTR- und der CXCR4-Expression und den klinischen Daten	75
5.4.1	Einfluss des Alters der Patienten auf die SSTR- und CXCR4-Expression	75
5.4.2	Zusammenhang zwischen der SSTR- und der CXCR4-Expression und dem Grading der Tumore	75
5.4.3	Zusammenhang zwischen der SSTR- und der CXCR4-Expression und den Serum-AFP-Werten	75

5.4.4	Korrelationen zwischen den IRS-Score-Werten der verschiedenen untersuchten Rezeptoren	76
5.5	Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Entitäten	77
5.6	Zusammenhang zwischen der Ki-67-Expression der untersuchten Rezeptoren und den klinischen Daten	81
5.7	CXCR4- und SSTR5-Expression in Tumorgefäßen	82
6.	Diskussion	84
6.1	Patientendaten	84
6.2	Rezeptorexpression in den hepatozellulären Karzinomen	87
6.3	Rezeptorexpression in den cholangiozellulären Karzinomen	90
6.4	Rezeptorexpression in den Tumorgefäßen	91
7.	Schlussfolgerungen	93
8.	Literaturverzeichnis	94
9.	Anhang	102
9.1	Ehrenwörtliche Erklärung	102
9.2	Danksagung	103

1. Zusammenfassung

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist der häufigste Primärtumor der Leber und stellt die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache weltweit dar. Trotz moderner medizinischer Therapieoptionen und der umfangreichen Forschung in den letzten Jahrzehnten beträgt die 5-Jahresüberlebensrate nur etwa 5-10%. Ähnlich verhält es sich beim zweithäufigsten primären Lebertumor, dem cholangiozellulären Karzinom (CCC), welches zwar deutlich seltener auftritt, jedoch eine ebenso schlechte Prognose aufweist. Ein Grund dafür ist, dass beide Tumorentitäten aufgrund ihrer zunächst gering ausgeprägten und unspezifischen klinischen Symptomatik meist erst in späten Stadien diagnostiziert werden. Kurative Therapieverfahren können in diesen Stadien meist nur noch eingeschränkt oder gar nicht mehr angewendet werden. Im Laufe der letzten Jahre wurde daher eine Reihe palliativer Therapieoptionen entwickelt, welche jedoch die Prognose beider Tumorentitäten nur leicht verbessern konnten. Die Suche nach weiteren, effektiveren Therapieansätzen ist daher auch heute noch Gegenstand intensiver Forschung.

Somatostatin ist ein Polypeptid, welches physiologisch im menschlichen Organismus vorkommt und eine Vielzahl von Funktionen besitzt, die wiederum multiple Organsysteme beeinflussen. Aufgrund dieser zahlreichen Effekte wurde es Gegenstand verschiedenster Studien in unterschiedlichen medizinischen Bereichen, unter anderem auch in der Tumorthherapie. Somatostatin bindet im menschlichen Organismus an 5 verschiedene Rezeptoren (Somatostatin-Rezeptoren (SSTR) 1, 2A, 3, 4 und 5), welche allesamt zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören und in unterschiedlicher Häufigkeit in verschiedenen Organen vorkommen. Im Laufe der letzten Jahrzehnte konnte eine vermehrte Expression einzelner SSTRs auch in einer Reihe von Tumoren, insbesondere in neuroendokrinen Tumoren, nachgewiesen werden. Daher wurden Medikamente entwickelt (sogenannte Somatostatinanaloga (SSA)), welche über diese Rezeptoren das Zellwachstum in solchen Tumoren hemmen und somit das Überleben der Patienten verlängern sollen. Da erste Studien zur Wirksamkeit solcher SSA vielversprechende Ergebnisse zeigten, wurde die Erforschung der SSTR-Expression auch in anderen Tumorentitäten forciert. Während für die HCCs in den letzten Jahren sehr kontroverse Ergebnisse zu diesem Thema veröffentlicht wurden, gibt es zur SSTR-Expression in CCCs bisher kaum Publikationen.

Eine weitere Gruppe von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die aufgrund ihrer multiplen Lokalisation im humanen Organismus in den Fokus zahlreicher Untersuchungen gerückt ist, stellen die Chemokinrezeptoren dar. Ihre Liganden, die Chemokine, welche wiederum zur

Familie der Zytokine gehören, sind kleine Proteine und besitzen neben der Chemotaxis (Bewegung von Zellen entlang eines Konzentrationsgradienten während Entzündungsreaktionen), der sie ihren Namen verdanken, zahlreiche Funktionen. Sie beeinflussen die Organentwicklung, Angiogenese, Leukozytenrezirkulation sowie immunregulatorische Prozesse. Durch die intensive Forschung in den letzten Jahren ist mittlerweile eine Vielzahl von Chemokinen und Chemokinrezeptoren entdeckt worden. Einige Studien konnten zudem eine Überexpression bestimmter Chemokinrezeptoren in verschiedenen Tumoren nachweisen. Für das HCC wurde insbesondere eine starke Expression des Rezeptors CXCR4 im Vergleich zu normalem Lebergewebe beschrieben. Analog zur SSTR-Expression gibt es auch für die CXCR4-Expression in CCCs kaum veröffentlichte Daten.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es nun, einen Überblick über die Expression der SSTRs und des Chemokinrezeptors CXCR4 in HCCs und CCCs zu schaffen, um bestehende Therapieverfahren zu optimieren oder weitere Therapieansätze zu finden. Hierzu wurden 56 Tumorproben von 18 Patienten mit einem HCC und 43 Präparate von 11 Patienten mit einem CCC aufbereitet und mittels spezifischer Antikörper immunhistochemisch auf die Expression dieser 6 Rezeptoren hin untersucht. Des Weiteren wurden zu jedem Präparat eine Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung sowie immunhistochemische Färbungen zur Darstellung der Ki-67- und CD34-Expression angefertigt. Alle Präparate wurden anschließend per Lichtmikroskopie untersucht und mit Hilfe des Immunreaktiven Scores nach Remmele und Stegner (IRS) ausgewertet.

Für die HCC-Präparate ergaben sich recht niedrige IRS-Scores und geringe Expressionsraten für die SSTRs. Mit 16,7% der Fälle war der SSTR5 der am häufigsten exprimierte SSTR, gefolgt von den SSTRs 2 und 3, die in jeweils 5,6% der Fälle auftraten. Für den SSTR1 und den SSTR4 konnte keine Expression nachgewiesen werden. Der CXCR4 kam in 38,9% der Fälle vor und war somit der am häufigsten exprimierte Rezeptor in den untersuchten HCC-Präparaten. Ein anderes Bild ergab sich für die Schnitte der CCCs. Hier stellte der SSTR1 mit einer Expression in 72,7% der Fälle den am häufigsten nachweisbaren Rezeptor dar, gefolgt vom CXCR4, welcher in 63,6% der Fälle auftrat. Zweithäufigster SSTR war mit 27,3% der Fälle der SSTR2. Während der SSTR5 nur in 9,1% der Tumoren exprimiert wurde, konnten der SSTR3 und der SSTR4 in keinem der Präparate nachgewiesen werden. Unabhängig von der Anfärbung der Tumorzellen fiel in der histologischen Auswertung eine starke Expression des SSTR5 und des CXCR4 in den Tumorgefäßen beider Tumorentitäten auf. In 53,3% der HCC-Präparate und in 70% der CCC-Präparate konnte eine vaskuläre CXCR4-Expression, in

20% der HCC-Präparate und in 40% der CCC-Präparate eine in den Gefäßendothelien lokalisierte SSTR5-Expression beobachtet werden. In der statistischen Auswertung zeigten die HCC-Patienten mit positiver vaskulärer CXCR4-Expression zudem ein signifikant geringeres medianes Überleben als solche mit CXCR4-Negativität der Tumorgefäße (10 Monate vs. 37 Monate; Log-Rank-Test: $p = 0,029$).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstreichen die bereits in anderen Studien geäußerten Vermutungen einer Differenz des SSTR-Besatzes von HCCs in Abhängigkeit von der Ätiologie und eventuell auch von der Ethnie und somit auch die Zweifel an einer Wirksamkeit von SSA bei HCC-Patienten in westlichen Ländern. Im Gegensatz dazu wurde hiermit erstmals eine differenzierte Analyse der SSTRs in CCCs durchgeführt, mit dem Ergebnis einer deutlichen Expression des SSTR1. Somit stellt der Einsatz des SSA Pasireotid bei dieser Tumorentität eine vielversprechende Therapieoption dar, da es im Gegensatz zu anderen SSAs auch an den SSTR1 bindet. Jedoch sollte dieses Ergebnis in weiteren Studien mit größeren Fallzahlen zunächst weiter evaluiert werden. Auch die deutliche Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 sowohl in den Tumorzellen von HCCs und CCCs als auch in den zugehörigen Tumorgefäßen kommt als weiterer Therapieansatz für die beiden Tumorentitäten in Frage und sollte daher in den Fokus künftiger Forschungen rücken.

2 Einleitung

2.1 Das hepatozelluläre Karzinom

2.1.1 Definition und Epidemiologie

Die hepatozellulären Karzinome (HCC) sind maligne Tumore und machen etwa 90% der primären Lebertumore aus (Gomez und Lobo 2011). Weltweit belegen sie Platz fünf der häufigsten Neoplasien bei Männern (El-Serag und Rudolph 2007, Gobel et al. 2013, Gomez und Lobo 2011) und Platz sieben bei Frauen (de Lope et al. 2012, Knudsen et al. 2014). Es werden etwa 600.000 Neuerkrankungen pro Jahr gezählt, wobei die Inzidenz vor allem in den westlichen Ländern weiterhin steigt. Die höchsten Erkrankungsraten finden sich in China, Südost-Asien sowie Afrika, hier v.a. in den Ländern südlich der Sahara (El-Serag und Rudolph 2007). Mit über 600.000 Todesfällen, machen HCC weltweit die dritthäufigste krebbsbedingte Todesursache aus (Chuang et al. 2009, de Lope et al. 2012, Gobel et al. 2013, Gomez und Lobo 2011). Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt je nach Region zwischen 5 und 10% (Chuang et al. 2009, Knudsen et al. 2014). Abhängig vom Stadium beträgt das mediane Überleben unbehandelt zwischen 3 Monaten und 3 Jahren.



Abbildung 2.1: Makroskopische Darstellung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) im intraoperativen Situs (Aufnahme freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. Kämmerer, Zentralklinik Bad Berka)

Neben den geographischen Komponenten spielen zudem auch Alter und Geschlecht eine Rolle für die Inzidenzraten. So ist in fast allen Populationen das Risiko, an einem HCC zu erkranken, für die männliche Bevölkerung höher als für die weibliche, wobei das Verhältnis je nach Region zwischen 2:1 und 4:1 liegt. In den mitteleuropäischen Breitengraden ist dieser

Unterschied sogar noch größer (Chuang et al. 2009, El-Serag und Rudolph 2007). Grund für das erhöhte Risiko für Männer, an einem HCC zu erkranken, scheint vor allem die erhöhte Bereitschaft zu sein, sich Risikofaktoren auszusetzen (de Lope et al. 2012, El-Serag und Rudolph 2007). Während das Verhältnis der Geschlechter relativ unabhängig von der zugrundeliegenden Population zu sein scheint, ist letztere ausschlaggebend für das Alter des Auftretens. So liegt in Ländern mit hoher Inzidenz wie in Afrika der Altersgipfel bereits zwischen 60 und 70 Jahren, während Populationen mit niedrigerem Risiko, aber auch die asiatische Bevölkerung, einen späteren Altersgipfel mit > 75 Jahren aufweisen. Gemeinsam haben alle, dass Frauen zum Zeitpunkt der Erkrankung etwa 5 Jahre älter sind als Männer (El-Serag und Rudolph 2007).

2.1.2 Risikofaktoren und Ätiologie

Der wohl weltweit bedeutendste Risikofaktor für die Entstehung eines HCC ist eine Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus (HBV). Dies gilt vor allem für Regionen mit sehr hohen Inzidenzraten, z.B. Asien oder Afrika, wo mehr als 70% der Patienten mit einem HCC eine Hepatitis-B-Infektion aufweisen (Knudsen et al. 2014).

Einen zweiten wichtigen Risikofaktor stellt eine Exposition gegenüber Aflatoxinen dar – Mykotoxine der Pilze *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus*, mit welchen Getreide, Nüsse und andere Gemüsearten kontaminiert sein können. Diese Mykotoxine kommen vermehrt in Afrika, Südost-Asien und China vor (Chuang et al. 2009). Patienten, die sowohl an Hepatitis B erkrankt, als auch einer erhöhten Aflatoxinbelastung ausgesetzt sind, entwickeln 60-mal häufiger ein HCC, als HBV-Infizierte ohne eine Belastung durch Aflatoxin. Dies lässt auf einen synergistischen Effekt schließen (Knudsen et al. 2014). Aflatoxin bindet nach Cytochrom-P-450-vermittelter Aktivierung zum Epoxid an die DNA und induziert dort durch Austausch von Basenpaaren Mutationen im p53-Tumorsuppressor-Gen, was eine alleinige HBV-Infektion nicht bewirkt (Chuang et al. 2009, Knudsen et al. 2014).

Im Gegensatz zu den bereits erwähnten Regionen in Asien und Afrika ist in Europa und in den USA die Hepatitis-C-assoziierte Leberzirrhose der Hauptrisikofaktor eines HCC. Patienten mit Hepatitis C haben ein 17-fach erhöhtes Risiko, ein HCC auszubilden (Knudsen et al. 2014).

Einen weiteren Risikofaktor bildet der Konsum bestimmter Genussmittel. Dabei ist die Bedeutung des Nikotin- und auch Koffeinkonsums als Risikofaktor für die HCC-Entstehung immer wieder umstritten (Chuang et al. 2009, El-Serag und Rudolph 2007). Nachgewiesen ist

jedoch die schädliche Wirkung eines übermäßigen Alkoholkonsums, da es hierdurch, vor allem durch die sekundäre Entwicklung einer Leberzirrhose, vermehrt zur Ausbildung von Lebertumoren kommt. In einer schwedischen Studie konnte gezeigt werden, dass das Risiko für die Entstehung eines HCC durch alleinigen Alkoholkonsum 2,3-fach und bei bereits induzierter Zirrhose sogar 16,5-fach erhöht war (Chuang et al. 2009). Weiterhin sind bei fast einem Drittel aller HCC-Fälle weltweit alkoholinduzierte Lebererkrankungen als verstärkender Faktor beobachtet worden. Zukünftig wird jedoch erwartet, dass auch die Bedeutung von Leberzirrhosen auf der Grundlage einer nicht-alkoholbedingten Fettleber (NASH) als Risikofaktor zunimmt. Die Zahl der NASH-Fälle wächst und einige Studien sehen Zusammenhänge zwischen dem Vorliegen einer NASH und einem erhöhten HCC-Risiko, wobei sich dies bisher nur auf die Patienten mit bereits entwickelter Zirrhose beschränkt (Knudsen et al. 2014). Die Zunahme der Fallzahlen für eine NASH erklärt sich vor allem auch über die insbesondere bei der westlichen Bevölkerung immer stärker verbreitete Fettleibigkeit, die wiederum auch zur Ausbildung eines Diabetes mellitus Typ 2 führen kann. Beide Erkrankungen stehen mit der Entwicklung einer NASH in engem Zusammenhang und sind somit ebenfalls zumindest als indirekte Risikofaktoren für die Entstehung von Lebertumoren zu sehen (Chuang et al. 2009, El-Serag und Rudolph 2007). Es gibt jedoch auch Studien, die einen direkten Zusammenhang zwischen dem Vorliegen eines Diabetes mellitus Typ 2 und der Ausbildung eines HCC vermuten lassen (El-Serag und Rudolph 2007). Eine weitere Erkrankung, welche mit der Entstehung einer Leberzirrhose und somit auch der eines HCC assoziiert ist, stellt die hereditäre Hämochromatose dar. Diese beruht zumeist auf einer Genmutation und führt zur Überladung der Eisenspeicher in der Leber. Allerdings gibt es auch hier nur vereinzelte Studien mit kleinen Fallzahlen, weshalb ein direkter Zusammenhang nur vermutet werden kann (Chuang et al. 2009, El-Serag und Rudolph 2007).

2.1.3 Klinische Überwachung und Diagnostik

Oftmals wird ein HCC erst erkannt, wenn bereits eine Symptomatik besteht. Dies kommt allerdings meist erst in fortgeschrittenen Stadien vor und bedeutet, dass der Tumor dann kaum noch heilbar bzw. ein Fortschreiten nicht mehr aufzuhalten ist. Daher versucht man durch eine kontinuierliche klinische Überwachung bei Patienten mit bestimmten Risikokriterien die Mortalität zu verringern, indem man den Tumor bereits in einem noch behandelbaren Stadium erkennt. Dies betrifft zum Beispiel Patienten mit Leberzirrhose, unabhängig von der Ätiologie, sowie Patienten mit chronischer Hepatitis B, die noch keine Zirrhose entwickelt haben, jedoch schon seit sehr langer Zeit daran erkrankt sind.

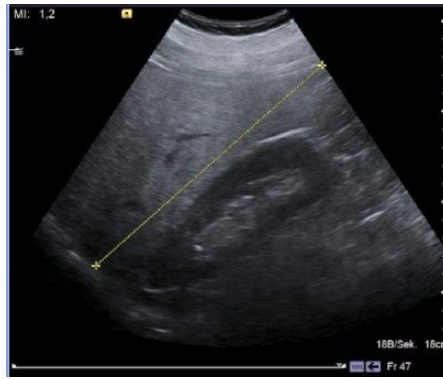


Abbildung 2.2: Sonographisches Bild eines hepatozellulären Karzinoms (Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. Kämmerer, Zentralklinik Bad Berka)

Die Standardmethode für diese Überwachung ist der Ultraschall. Mit einer Sensitivität von 65-80% und einer Spezifität von über 90% stellt er die derzeit beste Möglichkeit dar, ein HCC bereits frühzeitig zu erkennen. Im Optimalfall sind die Tumorknoten dabei noch kleiner als 2 cm. Allerdings ist zu beachten, dass ein HCC im Ultraschall sowohl echoarm, als auch echoreich erscheinen kann, was eine genaue Diagnose erschwert. Daher sollte bei entsprechenden Befunden immer eine weitere Abklärung erfolgen. Die zeitlichen Abstände der Ultraschalluntersuchungen sind derzeit umstritten. Es wird diskutiert, ob sie alle 3 oder alle 6 Monate durchgeführt werden sollten, wobei in mehreren Studien gezeigt werden konnte, dass ein kürzeres Intervall keinen wesentlichen Vorteil gebracht hat (de Lope et al. 2012).

Eine eher umstrittene Methode zur Früherkennung eines HCC ist der Einsatz des Alpha-Fetoproteins als serologischen Tumormarker. Es besitzt eine nur sehr begrenzte Sensitivität und ist auch nicht sehr spezifisch, da es auch bei alleiniger chronischer Hepatitis B oder C sowie beim cholangiozellulären Karzinom oder Magenkarzinom erhöht sein kann. Zudem ist seine Konzentration abhängig von der Tumorgöße, wodurch eher fortgeschrittene Tumorstadien erkannt werden. Auch durch eine Kombination der Bestimmung des α -Fetoproteins mit dem Ultraschall konnte keine Sensitivitätserhöhung beobachtet werden (de Lope et al. 2012).

Der Goldstandard für die endgültige Diagnose ist die ultraschallgesteuerte Biopsie. Allerdings ist diese bei kleineren Knoten meist schwierig oder aufgrund von Blutungsrisiken nicht durchführbar. Ein negativer Biopsiebefund schließt zudem eine Malignität nicht aus. Daher werden zusätzliche immunhistochemische Marker herangezogen, um die Diagnose zu stärken. Hierbei handelt es sich vor allem um das Hitzeschockprotein-70, die Glutaminsynthetase und das Glypican-3 (de Lope et al. 2012).

Letztendlich stützt man sich bei der Diagnose jedoch immer mehr auf bildgebende Verfahren. Dabei untersucht man die Verstärkungsmuster bei der Kontrastmittelaufnahme während der arteriellen Phase, gefolgt von der Kontrastauswaschung in der venösen Phase. Zur Bewertung dieses Verfahrens haben sich vor allem die Computertomographie (CT) und die Magnetresonanztomographie (MRT) bewährt. Das MRT besitzt hier für Knoten > 1 cm eine Spezifität von 96,6% und einen positiven Vorhersagewert von über 97%. Weisen die Läsionen jedoch nicht die typischen Verstärkungsmuster eines HCC auf, ist eine Biopsie unerlässlich (de Lope et al. 2012).

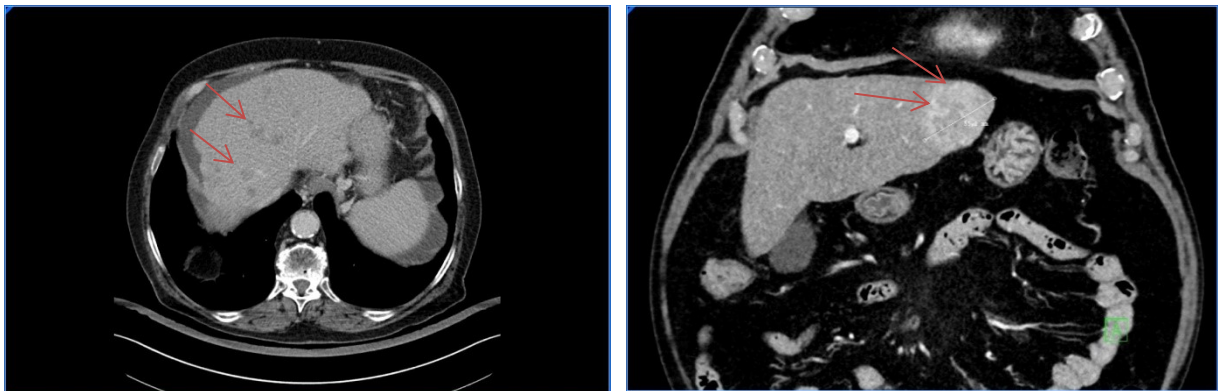


Abbildung 2.3: Computertomographisches Bild eines hepatozellulären Karzinoms (Pfeile) im Querschnitt (links) und Längsschnitt (rechts; Abbildungen freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. Kämmerer, Zentralklinik Bad Berka)

2.1.4 Klassifizierung

Unter den zahlreichen Klassifikationssystemen hat sich im europäischen Raum vor allem das Barcelona-Clinic-Liver-Cancer (BCLC)-Staging durchgesetzt, da es die Klassifizierung direkt mit der Therapie verknüpft. Es wurde 1999 entwickelt und aufgrund neuer medizinischer Erkenntnisse, z.B. nach Einführung der Chemoembolisation 2002 oder von Sorafenib 2008, mehrfach aktualisiert. Nach dem heutigen Stand werden 5 Stadien unterschieden: Das sehr frühe Stadium (0), das frühe Stadium (A), das Intermediärstadium (B), das fortgeschrittene Stadium (C) und das Endstadium (D). Zugrunde liegen der Einteilung zum einen die Größe, Anzahl und Verteilung der Knoten bzw. in späteren Stadien die Invasivität und Ausbreitung des Tumors. Zum anderen wird die Leberfunktion in Form des Child-Pugh-Scores sowie die Leistungsfähigkeit des Patienten berücksichtigt (de Lope et al. 2012).

Der Child-Pugh-Score ist ein Maß für die Funktionsfähigkeit der Leber und dient der Stadieneinteilung der Leberzirrhose, wodurch Aussagen zu deren Prognose ermöglicht werden. Anhand von 5 Kriterien, die jeweils mit 1-3 Punkten gewertet werden, werden die

Patienten in 3 Stadien (A bis C) eingeteilt (Child und Turcotte 1964, Gomez und Lobo 2011, Pugh et al. 1973).

Tabelle 2.1: Child-Pugh-Score nach Gomez und Lobo (2011): Stadium A = 5-6 Punkte, Stadium B = 7-9 Punkte, Stadium C = 10-15 Punkte

Kriterium	1 Punkt	2 Punkte	3 Punkte
Serum-Bilirubin (gesamt)	< 2,0 mg/dl	2,0 - 3,0 mg/dl	> 3,0 mg/dl
Serum-Albumin	> 3,5 g/dl	2,8 - 3,5 g/dl	< 2,8 g/dl
INR	1,7	1,7 - 2,3	> 2,3
Aszites (sonographisch)	keiner	leicht	mittelgradig
hepatische Enzephalopathie	keine	Stadium I-II	Stadium III-IV

Eine weitere, vor allem im asiatischen Raum gebräuchliche Einteilung ist das Okuda-Staging-System. Ebenso wie die BCLC-Klassifikation vereint es Tumoreigenschaften mit Leberfunktionsparametern (Tabelle 2.2). Es unterteilt die Patienten in 3 Stadien, verknüpft diese jedoch nicht mit Therapieoptionen. Zudem werden Variablen wie die Multilokularität, die Veneninfiltration oder die extrahepatische Streuung nicht berücksichtigt (Duseja 2014). Neben diesen beiden verbreiteten Klassifikationssystemen existieren noch zahlreiche weitere, wie das French-Staging-System, das CLIP (Cancer-of-the-Liver-Italian-Program), das JIS (Japan-Integrated-Staging), der Tokyo-Score und der CUPI (Chinese-University-Prognostic-Index) (Duseja 2014).

Tabelle 2.2: Okuda-Staging-System für hepatozelluläre Karzinome, modifiziert nach Duseja et al. (2014): Stadium I: keine positiven Kriterien, Stadium II: 1-2 positive Kriterien, Stadium III: 3-4 positive Kriterien

Kriterium	negativ (-)	positiv (+)
Tumorgröße	< 50%	> 50%
Aszites	nein	ja
Albumin	> 3 mg/dl	< 3 mg/dl
Bilirubin	3 mg/dl	> 3 mg/dl

2.1.5 Therapieoptionen

Das BCLC-Klassifikationssystem ist zwar sehr hilfreich bei der Richtungsvorgabe zur Therapie des HCC, jedoch erfasst es nicht alle Optionen der zahlreichen Therapiekonzepte. So werden zum Beispiel Kombinationstherapien und neuere Therapieformen noch nicht berücksichtigt. Im Folgenden wird eine Übersicht über die Vielzahl der Therapiemöglichkeiten gegeben.

Operative Verfahren

Die chirurgische Resektion ist nach wie vor das Mittel der Wahl, vor allem bei Patienten in frühen Stadien (BCLC 0 und A) sowie bei Patienten ohne Zirrhose, da sie neben der orthotopen Lebertransplantation (OLC) die einzige nachweislich kurative Therapieoption eines HCC darstellt. Allerdings sind nur 15-30% der HCC-Patienten in ein solches frühes Stadium einzuordnen. Außerdem sind chirurgische Eingriffe immer stark vom Allgemeinzustand des Patienten sowie von der Leberfunktion abhängig. Trotz allem sind die Mortalitätsraten solcher Eingriffe heutzutage sehr gering und die Ergebnisse mit einer 5-Jahresüberlebensrate von 40-70% ausgezeichnet. Es ist jedoch anzumerken, dass die Rezidivrate nach 5 Jahren mit 70-80% immer noch sehr hoch ist. Etwa zwei Drittel davon, sogenannte frühe Rezidive, treten innerhalb der ersten beiden Jahre infolge der Ausbreitung des Ersttumors auf. Die späten Rezidive entwickeln sich erst nach über 2 Jahren und werden eher als neue Tumore angesehen.

Das zweite operative Verfahren ist die OLC. Sie ist die aus onkologischer Sicht eigentlich anzustrebende Therapie, da sie zum einen sowohl jegliche Tumorherde in der Leber, als auch die Zirrhose als Risikofaktor beseitigt und zum anderen unabhängig von der Leberfunktion ist. Aufgrund des Mangels an Spenderorganen muss die Indikation für eine OLC jedoch sehr streng gestellt werden. Eine Lebertransplantation ist aktuell vor allem dann anzuraten, wenn der Patient die sogenannten Milan-Kriterien erfüllt, d.h. einen singulären Herd mit maximal 5 cm oder maximal drei Herde kleiner als 3 cm Durchmesser aufweist, welche weder Gefäße infiltriert noch extrahepatisch gestreut haben dürfen. Bei Erfüllung dieser Kriterien liegt die 5-Jahresüberlebensrate derzeit bei etwa 70% mit Rezidivraten von 5-15%. Da ähnliche Überlebensraten bei weiter gefassten Kriterien (z.B. San-Francisco-Kriterien) beobachtet wurden, wird derzeit jedoch diskutiert, ob die Milan-Kriterien nicht zu streng gestellt sind, sodass eine geringe Erweiterung möglicherweise gewinnbringend für Patienten wäre, welche die derzeitigen Richtwerte nicht erfüllen (de Lope et al. 2012, Gobel et al. 2013).

Lokoregionäre Verfahren

In diesem Bereich häufig angewendete Verfahren sind die Radiofrequenzthermoablation (RFA) und die perkutane Ethanolinjektion (PEI). Das Prinzip der RFA ist die Eliminierung des Tumors durch Reibungswärme, welche durch einen oszillierenden, hochfrequenten Wechselstrom erzeugt wird. Der PEI liegen hingegen Denaturierungsprozesse durch Injektion eines hochprozentigen Alkohols zugrunde. Beide Verfahren zeigen sehr gute Ergebnisse in der Behandlung von Tumoren mit bis zu 2 cm Durchmesser. Bei größeren Tumoren kann jedoch die RFA zu besseren Resultaten führen als die PEI. Bezüglich schwerwiegender Komplikationen gibt es nahezu keinen Unterschied, allerdings hat die RFA insgesamt eine etwas höhere Komplikationsrate. Insgesamt ist die RFA die derzeit wohl beste ablativ Behandlungsmethode, allerdings ist sie nicht überall einsetzbar. Dies betrifft vor allem Tumoren in der Nähe zu benachbarten Organen, wie Niere, Kolon oder Gallenblase sowie großen Gefäßen, da hier das Risiko einer Schädigung durch Hitze meist zu groß ist. Hier kommt die PEI zur Anwendung. Im Vergleich zu den operativen Verfahren sind die 5-Jahresüberlebensraten zwar schlechter, allerdings sind die Mortalität und die Morbidität bei der RFA deutlich geringer. Die Rezidivrate ist mit etwa 80% nach 5 Jahren mit der Resektion vergleichbar. Außerdem bietet die RFA als parenchym-schonendes Verfahren eine Möglichkeit zur Überbrückung zur Transplantation.

Eine weitere verbreitete Methode ist die Transarterielle Chemoembolisation (TACE), welche sich vor allem bei inoperablen und multilokulären HCCs durchgesetzt hat. Sie basiert auf der hohen arteriellen Blutversorgung von HCCs und stellt eine Kombination aus Devaskularisation und lokaler Chemotherapie dar. Der Verschluss des zuführenden Gefäßes führt zur Nekrose im Tumorgebiet und verzögert somit dessen Ausbreitung. Mittlerweile gibt es sowohl zahlreiche Chemotherapeutika (z.B. Doxorubicin, Lipiodol, Cisplatin) als auch verschiedenste Embolisationsmaterialien, wie Gelatinepartikel oder Stärke-Mikrosphären. Allerdings existieren bisher noch keine einheitlichen Standards für die Wahl des Therapeutikums, des Embolisats oder der Dosis. Die optimale Zielgruppe für das TACE-Verfahren sind vor allem Patienten mit erhaltener Leberfunktion und ohne extrahepatische Streuung oder Gefäßinvasion (BCLC B). Hier konnte durch die Behandlung die mittlere Überlebensrate im Vergleich zu Patienten ohne Behandlung von 16 auf über 24 Monate verlängert werden. Allerdings gibt es auch bei der TACE Einschränkungen. Zu den absoluten Kontraindikationen zählen hier eine vorbestehende Pfortaderthrombose sowie eine Leberfunktion entsprechend eines Child-Pugh-Stadiums C.

Die selektive, interne Radiotherapie (SIRT) stellt eine Behandlungsalternative zur TACE dar, da sie sehr ähnliche Indikationsspektren besitzt. Bei dieser Methode werden dem Patienten intraarteriell Radionuklide verabreicht, welche an Kunstharze (SIR-Spheres®) oder Glasmikrosphären (Tetraspheres®) gebunden sind. Das am weitesten verbreitete Radionuklid ist Yttrium-90 (Y90), ein reiner Betastrahler mit einer kurzen Reichweite von 2,5 mm. Im Gegensatz zu anderen lokal ablativen Verfahren reicht bei der SIRT meist eine einzelne Therapiesitzung aus. Dem gegenüber stehen jedoch der große logistische Aufwand und die hohen Kosten. Außerdem gibt es bisher keine randomisierten Studien, die eine Beurteilung eines eventuellen Vorteils der Behandlung durch SIRT gegenüber den anderen lokoregionären Verfahren ermöglichen. Erste Berichte über die Ergebnisse einer Behandlung von Patienten mit Y90 sind jedoch in Bezug auf Sicherheit, mediane Überlebensrate und progressionsfreie Zeit positiv zu bewerten.

Es gibt noch eine Reihe weiterer lokoregionärer Verfahren, deren Nutzen und Risikoprofil derzeit noch genauer untersucht werden. Hierzu zählen die Mikrowellenablation (MWA), basierend auf Reibungswärme durch Anregung von Wassermolekülen im elektromagnetischen Feld, der hochintensive fokussierte Ultraschall (HIFU) sowie die stereotaktische Bestrahlung (SBRT). Für die Kombination HIFU und TACE konnte bereits eine Überlegenheit gegenüber der alleinigen TACE-Therapie bezüglich des Gesamtüberlebens nachgewiesen werden. Welche Auswirkungen diese neueren Therapieverfahren jedoch auf das Behandlungskonzept von HCC-Patienten haben werden, bleibt abzuwarten (de Lope et al. 2012, Gobel et al. 2013).

Systemische Therapieverfahren

Bis vor kurzem gab es keine effektive Behandlungsmöglichkeit für Patienten im fortgeschrittenen Stadium eines HCC (BCLC C). Mittlerweile besteht mit dem Multikinaseinhibitor Sorafenib die einzige systemisch wirksame Therapieoption. Es wirkt sowohl antiproliferativ, als auch anti-angiogenetisch. In der SHARP-Studie konnten zum einen eine signifikant höhere mediane Überlebensrate von 10,7 Monaten bei Patienten unter Sorafenib-Behandlung gegenüber 7,9 Monaten in der Placebogruppe und zum anderen eine signifikant vergrößerte zeitliche Differenz bezüglich der Tumorprogression – 5,5 Monate in der Sorafenib-Gruppe, 2,8 Monate in der Placebo-Gruppe – nachgewiesen werden (Gobel et al. 2013). Nachteilig ist jedoch das umfangreiche Nebenwirkungsprofil, welches Gewichtsabnahme, Übelkeit, Erbrechen, Heiserkeit und Bluthochdruck umfasst und häufig eine Dosisreduktion oder Unterbrechung der Therapie notwendig macht (Balogh et al. 2016).

Neben Sorafenib ist in den letzten Jahren auch die Wirksamkeit weiterer Medikamente zur systemischen Therapie eines fortgeschrittenen HCC untersucht worden. Hierzu zählen Brivanib, Everolimus und der monoklonale Antikörper Ramucirumab. Allerdings verfehlten die hierzu durchgeführten randomisierten, placebo-kontrollierten Doppelblindstudien (BRISK-PS-Studie für Brivanib, EVOLVE-1-Studie für Everolimus, REACH-Studie für Ramucirumab) ihre jeweiligen Endpunkte (Kudo et al. 2016).

2.2 Das cholangiozelluläre Karzinom

2.2.1 Definition und Epidemiologie

Das cholangiozelluläre Karzinom (CCC) ist der häufigste maligne Tumor des Gallengangssystems und nach dem hepatozellulären Karzinom (HCC) der zweithäufigste primäre Tumor der Leber (Khan et al. 2012, Yao et al. 2014). Bei den meisten CCCs handelt es sich histologisch um Adenokarzinome. Inzidenz und Mortalitätsrate haben in den westlichen Ländern während der letzten Jahrzehnte zugenommen, wobei das Verhältnis bezüglich der Geschlechter eine leichte Prädominanz bei Männern zeigt (1,2 - 1,5 pro 100 000 gegenüber 1 pro 100 000) (Khan et al. 2012, Razumilava und Gores 2014).



Abbildung 2.4: Makroskopisches Bild eines cholangiozellulären Karzinoms nach Resektion (Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. Kämmerer, Zentralklinik Bad Berka)

Über den Altersgipfel für das Auftreten cholangiozellulärer Karzinome gibt es unterschiedliche Angaben. Während in einer Publikation von Khan et al. (2012) die siebente Lebensdekade benannt wird, sprechen Soares et al. (2014) von der sechsten Lebensdekade und Rizvi und Gores (2013) sogar vom 50. Lebensjahr. Mit einer mittleren Überlebensrate von 24 Monaten nach Diagnosestellung und einer 5-Jahresüberlebensrate von 10% ist die

Prognose insgesamt sehr schlecht (Khan et al. 2012, Rizvi und Gores 2013). In England und Wales sterben mittlerweile mehr Menschen an einem CCC als an einem HCC (Khan et al. 2012). Anatomisch unterscheidet man zwischen intrahepatischem, perihilärem und distalem Subtyp, welche sich ebenfalls hinsichtlich der Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese unterscheiden. Dies hat auch Auswirkungen auf die Behandlungsstrategien des jeweiligen Subtyps (Razumilava und Gores 2014, Rizvi und Gores 2013).

2.2.2 Risikofaktoren

Es gibt verschiedene Risikofaktoren für die Entstehung eines CCC, die jedoch in weniger als 30% der Fälle wirklich nachweisbar sind. Die meisten CCCs entstehen sporadisch (Khan et al. 2012). Zudem sind die Risikofaktoren abhängig vom geographischen Standort. In den westlichen Ländern besteht ein nachweislich bekannter Zusammenhang zwischen dem CCC (vor allem dem perihilären) und der primär sklerosierenden Cholangitis (PSC). Die Lebenszeitprävalenz von Patienten mit einer PSC, ein CCC zu entwickeln, liegt zwischen 5% und 10%. Bei den meisten Patienten entsteht das CCC innerhalb von 24 Monaten nach der Diagnosestellung der PSC. Das Durchschnittsalter dieser Patienten ist mit dem 4. Lebensjahrzehnt auch deutlich niedriger als bei CCC-Patienten ohne eine PSC als Komorbidität (6.-7. Lebensdekade). In Südostasien, hingegen, ist einer der wichtigsten Risikofaktoren (Inzidenz 113 von 100 000) die Infektion mit den Parasiten *Ophistorchis viverrini* und *Clonorchis sinensis*. Beide Trematoden verursachen chronische Entzündungsreaktionen in den Gallengängen und sind nachweislich kanzerogen. Weitere prädisponierende Faktoren im asiatischen Raum sind die Hepatolithiasis und zystische Veränderungen der Gallenblase, einschließlich des Caroli-Syndroms. Vor allem Patienten mit Gallenblasenzysten entwickeln bereits in jungen Jahren ein CCC (Durchschnittsalter 32 Jahre) bei einer Lebenszeitprävalenz von 6-30%. Zudem scheinen die Ausbildung einer Leberzirrhose sowie die Infektion mit dem Hepatitis-B- und Hepatitis-C-Virus eine prädisponierende Rolle bei der Entwicklung eines intrahepatischen CCC zu spielen, wobei auch hier regionale Unterschiede festzustellen sind. In den westlichen Ländern überwiegt die Assoziation mit dem HCV-Virus, während im asiatischen Raum der HBV-Virus eine größere Rolle spielt. Untersuchungen bezüglich des Zusammenhangs zwischen der Ausbildung eines CCC und dem Konsum von Alkohol oder Tabak konnten keine eindeutigen Ergebnisse liefern. Jedoch konnte bei dem ehemaligen Röntgenkontrastmittel Thorotrast, welches mittlerweile vom Markt genommen wurde, eine bis zu 300%ige Risikoerhöhung für die Entwicklung eines CCC nachgewiesen werden. Zudem scheinen auch genetische Aspekte

eine entscheidende Rolle zu spielen. Die verschiedenen identifizierten genetischen Polymorphismen, die das Risiko der Ausprägung eines CCC verstärken, lassen sich drei Gruppen zuordnen. Die Gene codieren jeweils für Proteine, welche am Reparaturmechanismus der DNA beteiligt sind, der zellulären Abwehr von Toxinen oder der immunologischen Überwachung dienen (Razumilava und Gores 2014, Rizvi und Gores 2013).

2.2.3 Klassifikation

Basierend auf der anatomischen Einteilung in Subtypen bestehen verschiedene Stagingssysteme. Für die perihilären Karzinome ist die Bismuth-Corlette-Klassifikation eine gebräuchliche Einteilung. Erstmals 1975 entwickelt, wurde sie bereits mehrfach überarbeitet und beinhaltet vor allem eine anatomische Umschreibung der Lokalisation und der Ausbreitung des Karzinoms innerhalb des Gallengangssystems. Sie wird daher hauptsächlich zur präoperativen Abschätzung des Resektionsausmaßes verwendet. Allerdings hat dieses Klassifikationssystem auch Schwächen, da es weder Informationen zur Gefäßbeteiligung, noch über eine eventuelle Metastasierung gibt. Daher lassen sich damit kaum Aussagen über die Prognose machen (Bismuth und Corlette 1975, Khan et al. 2012, Soares et al. 2014).

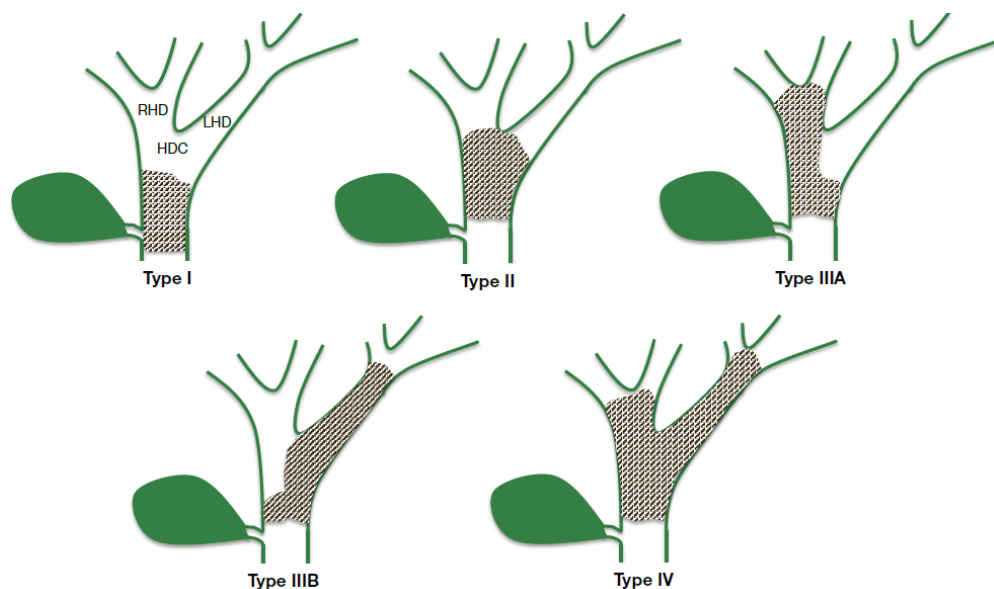


Abbildung 2.5: Die Bismuth-Corlette-Klassifikation des hilären cholangiozellulären Karzinoms nach Soares et al. (2014): Typ I: der Tumor liegt unterhalb der Hepatikusgabel, Typ II: der Tumor bezieht die Hepatikusgabel mit ein, Typ III: der Tumor betrifft die Hepatikusgabel sowie entweder den rechten oder den linken Hepatikushauptast, Typ IV: der Tumor bezieht beide Hepatikushauptäste mit ein

Ein ähnliches Klassifikationssystem für perihiläre Karzinome ist das Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC). Dieses berücksichtigt im Vergleich zur Bismuth-Colette-Klassifikation zusätzlich zur longitudinalen auch die radiäre Ausbreitung des Tumors sowie die Pfortaderbeteiligung und die Atrophie der Leberlappen. Allerdings sind auch hier keine Angaben zu Lymphknoten- oder Fernmetastasen enthalten. Die MSKCC eignet sich vor allem zur präoperativen Beratung des Patienten bezüglich der Möglichkeit einer R0-Resektion (Soares et al. 2014, Valero et al. 2012).

Wie bei vielen anderen Tumorentitäten gibt es auch für das cholangiozelluläre Karzinom eine TNM-Klassifikation. Die siebente Auflage der sogenannten AJCC-Klassifikation (American Joint Committee on Cancer) unterscheidet dabei zwischen intra- und extrahepatischen Tumoren, wobei die extrahepatischen nochmals in perihiläre und distale Gallengangstumoren unterteilt werden. Im Gegensatz zu den oben genannten Stagingssystemen werden hier Gefäßbeteiligung, Lymphknoten- und Fernmetastasen berücksichtigt. Es eignet sich besser zur postoperativen Beurteilung, hat jedoch weniger Aussagekraft bezüglich der Resektionsplanung. Zudem steht es in der Kritik, da es die Invasionstiefe des Tumors innerhalb der T-Klassifikation nicht berücksichtigt und es Anzeichen dafür gibt, dass diese bezüglich prognostischer Vorhersagen einen wichtigen Faktor darstellt.

Aufgrund der Schwierigkeiten durch die Vielzahl an Klassifikationssystemen hat eine Gruppe von Experten um DeOliveira ein neues Stagingssystem ausgearbeitet, welches die Vorteile aller vorhandenen Klassifikationen kombinieren soll. Es beinhaltet unter anderem Tumorgöße, Ausbreitung des Tumors im Gallengangssystem, Gefäßbeteiligung sowie Lymphknotenstatus und Aussagen über Fernmetastasen. Dadurch sollen anatomische, pathologische und chirurgische Interessen vereint werden. Allerdings muss es erst noch durch die internationalen Gemeinschaften anerkannt werden (Soares et al. 2014, Valero et al. 2012).

2.2.4 Diagnostik

Aufgrund der vielfältigen Ausprägung, unterschiedlichen Lokisationsmöglichkeiten und milden klinischen Symptomatik stellt die Diagnostik der cholangiozellulären Karzinome eine Herausforderung dar, welche multidisziplinärer Ansätze bedarf (Rizvi und Gores 2013).

Das klinische Erscheinungsbild hängt stark von Stadium und Lokalisation des Tumors ab. Frühe Stadien weisen meist kaum klinische Symptome auf, was bedeutet, dass die meisten CCCs erst in späteren Stadien diagnostiziert werden. Hier zeigt sich vor allem bei extrahepatischen Karzinomen oft eine Symptomatik der Gallenwegsobstruktion, mit Juckreiz, blassen Stühlen, dunklem Urin und Ikterus. Patienten mit intrahepatischen Tumoren,

hingegen, beklagen meist abdominelle Beschwerden, auch aufgrund der häufig vorliegenden Hepatomegalie. Zum allgemeinen klinischen Beschwerdebild gehören neben Unwohlsein und Schwächegefühl auch die Trias der B-Symptomatik mit Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust (Khan et al. 2012, Rizvi und Gores 2013).

Auch labortechnisch steht die Gallengangsobstruktion im Vordergrund. Hier zeigt sich meist eine Erhöhung des Bilirubins (vor allem des konjugierten Bilirubins) und der alkalischen Phosphatase, bei häufig normalen Aminotransferasen. Letztere können jedoch bei akuter Obstruktion oder begleitender Cholangitis ebenfalls erhöht sein (Khan et al. 2012, Rizvi und Gores 2013).

Eine längerfristige biliäre Obstruktion kann zudem eine verminderte Aufnahme fettlöslicher Vitamine bewirken, was sich z.B. in einer erhöhten PTT widerspiegeln kann. Zudem kann es bei fortgeschrittenen Stadien auch zu Veränderungen unspezifischer Laborparameter wie CRP, Albumin oder Hämoglobin kommen (Khan et al. 2012).

Wie bei vielen Tumorarten gibt es auch für das CCC bestimmte Tumormarker, deren Aussagekraft jedoch begrenzt ist. Der gebräuchlichste ist hier das CA 19-9. Mit einer Sensitivität von 40-70% und einer Spezifität von 50-80% (Khan et al. 2012) hat es zwar einen Wert für die postoperative Prognose und das Screening von Patienten mit prädisponierenden Risikofaktoren, eignet sich jedoch nur im Zusammenhang mit weiteren Diagnosekriterien, da es nicht zwischen einem CCC und pankreatischen oder gastralen malignen Prozessen unterscheiden kann. Zudem ist es nicht bei jedem CCC-Patienten erhöht. Es werden derzeit weitere Tumormarker untersucht, die das Potential zeigten, eine höhere Aussagekraft und Korrelation mit der Ausbreitung der Tumorerkrankung als das CA 19-9 zu besitzen (z.B. Matrix-Metalloproteinase-7, Mac-2BP, Tumor-M2-PK und andere). Jedoch liegen noch keine validierten Ergebnisse aus größeren Studien hierzu vor (Khan et al. 2012, Rizvi und Gores 2013).

Ein wichtiges Kriterium zur Diagnosesicherung sind bildgebende Verfahren. Auch hier bieten sich zahlreiche Möglichkeiten, die alle ihre Vor- und Nachteile besitzen. Die abdominelle Ultraschalluntersuchung eignet sich vor allem zur Sicherung von Gallengangserweiterungen und zum Ausschluss von Gallensteinen, ist jedoch untersucherabhängig und als alleiniges Instrument zur Diagnosesicherung nicht genau genug. Zur besseren Charakterisierung eines Tumors müssen daher weitere bildgebende Verfahren zu Rate gezogen werden. Die Kontrastmittel-Computertomographie hat mit bis zu 80% eine höhere Sensitivität zur Detektion eines CCC als der Ultraschall. Zudem lassen sich genauere Aussagen zur Anatomie, zur Tumorgroße, zum Ausmaß der Gallengangserweiterung, zum

Lymphknotenstatus und zu Satellitenherden machen. Allerdings ist auch hier die Darstellung des Tumors manchmal zu unscharf und lässt sich nicht sicher zu einer PSC abgrenzen.

Mithilfe der Kombination von Magnetresonananz-Cholangiopankreatikographie (MRCP) mit MRT steht noch ein weiteres nichtinvasives bildgebendes Verfahren zur optimalen prätherapeutischen Befundung zur Verfügung. Durch die hohe Auflösung lassen sich genaue Aussagen über den Status der Gallengänge, des Leberparenchyms und einer Gefäßbeteiligung treffen. Allerdings ist es dem CT bezüglich der Detektion von Fernmetastasen, insbesondere in Lunge und Knochen, unterlegen. Daher sollten die genannten Verfahren zum optimalen prätherapeutischen Staging kombiniert werden (Khan et al. 2012, Rizvi und Gores 2013).

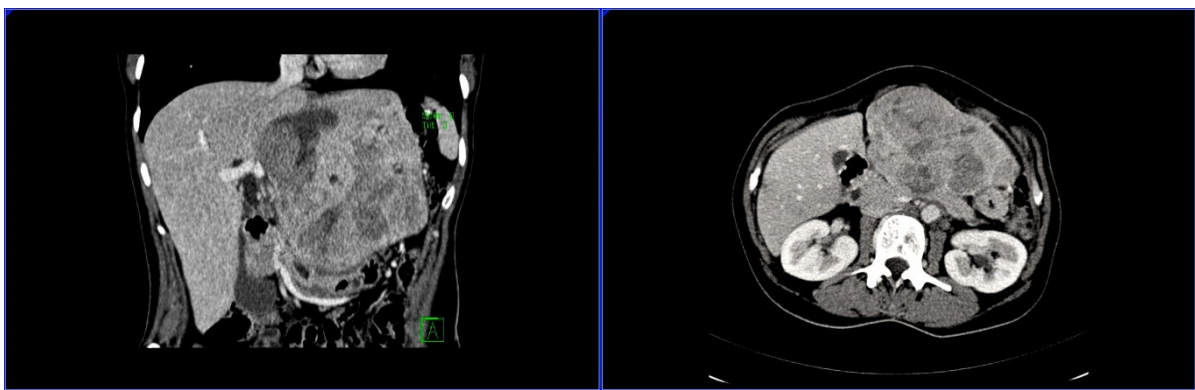


Abbildung 2.6: Computertomographische Darstellung eines cholangiozellulären Karzinoms im Längs- (links) und Querschnitt (rechts; Abbildungen freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. Kämmerer, Zentralklinik Bad Berka)

Die 18F-PET-CT, welches sich für viele andere Tumorentitäten als wertvolles diagnostisches Instrument erwiesen hat, zeigte für die Diagnosesicherung eines CCC keine signifikanten Vorteile gegenüber der CT oder der MRT/MRCP. Allerdings scheint es eine höhere Genauigkeit bei der Suche nach Lymphknoten- und Fernmetastasen aufzuweisen, was jedoch noch in weiteren Studien überprüft werden muss.

Trotz dieser guten diagnostischen Verfahren ist es manchmal nicht möglich, mittels nichtinvasiver Diagnostik eine sichere Aussage über die Benignität bzw. Malignität einer Raumforderung zu treffen. Dazu wird histologisches Material benötigt, welches durch invasive Verfahren wie eine Feinnadelbiopsie mit Hilfe eines endoskopischen Ultraschallverfahrens (EUS) oder Bürstenzytologie per Cholangiographie (ERCP) gewonnen werden muss. Allerdings sind weniger als 50% der Standard-Bürstenzytologien bei cholangiozellulären Karzinomen positiv, weshalb negative Zytologiebefunde auch nicht als Ausschluss dienen können. Kombiniert man die Zytologie mit einer Biopsie, kann man die Ausbeute immerhin auf bis zu 70% steigern. Hierbei hat sich die Fluoreszenz-in-situ-

Hybridisierung (FISH) von großem Nutzen erwiesen. Sie erkennt Aneuploidien in Zellen, wodurch bei 60% der Patienten mit ursprünglich negativer Zytologie ein Karzinom diagnostiziert werden kann (Khan et al. 2012, Rizvi und Gores 2013).

2.2.5 Therapie

Für die Behandlung des cholangiozellulären Karzinoms steht eine Vielzahl therapeutischer Optionen zur Auswahl, deren Verfügbarkeit und Erfolgsaussichten jeweils stark von der Lokalisation und dem Stadium des Tumorwachstums abhängig sind.

Chirurgische Therapieverfahren

Für chirurgische Interventionen macht es Sinn, zwischen den unterschiedlichen anatomischen Subtypen (intrahepatisch, perihilär, distal) zu differenzieren, da aufgrund der unterschiedlichen Tumorlokalisation auch verschiedene operative Ansätze notwendig sind.

Intrahepatisches cholangiozelluläres Karzinom (iCCA)

Das Mittel der Wahl für die Behandlung des iCCA stellt als einziger kurativer Ansatz die chirurgische Tumoresektion dar. Allerdings ist bei weniger als einem Drittel der Patienten ein operativer Therapieansatz zum Zeitpunkt der Diagnose noch möglich (Khan et al. 2012). Die Entscheidung hierfür ist abhängig vom künftigen Restvolumen der Leber und dem Allgemeinzustand des Patienten. Eine Kontraindikation stellt vor allem das Vorhandensein von Peritoneal- und Fernmetastasen dar. Trotz allem ist die Prognose auch nach chirurgischer Resektion schlecht, wobei die Angaben zur 5-Jahres-Überlebensrate zwischen 22% und 44% (Khan et al. 2012) bis hin zu 60% (Rizvi und Gores 2013) schwanken. Prognostisch relevant sind hierbei die Lymphknoten- und Gefäßinvasion, eine multiple Tumorlokalisation, das Vorliegen einer Leberzirrhose sowie vor allem der R0-Status (Khan et al. 2012, Rizvi und Gores 2013). Um diesen R0-Status zu erreichen, sind neben einer lokalen oder Laparenresektion auch größere Leberteilresektionen notwendig (Khan et al. 2012, Yao et al. 2014).

Die Lebertransplantation stellt eventuell eine weitere kurative Therapiealternative dar, ist jedoch sehr umstritten. In der Vergangenheit wurden mit der Lebertransplantation ein rasches Wiederauftreten des Karzinoms und sehr schlechte Überlebensraten von 10% assoziiert (Khan et al. 2012). Jüngste Studien zeigten jedoch 5-Jahres-Überlebensraten von über 70% für Patienten, bei denen eine Transplantation erst nach erfolgreichem Ansprechen auf eine vorher erfolgte Chemotherapie durchgeführt wurde (Khan et al. 2012, Rizvi und Gores 2013). Da

diese Daten jedoch alle aus einem einzigen amerikanischen Zentrum stammen, lassen sie sich noch nicht verallgemeinern, geben jedoch Hoffnung auf Fortschritte bezüglich der Transplantation als kuratives Therapiekonzept (Khan et al. 2012, Yao et al. 2014).

Extrahepatisches cholangiozelluläres Karzinom

Die extrahepatischen CCCs werden nach der AJCC-Klassifikation weiter in *perihiläre (pCCA)* und *distale (dCCA)* cholangiozelluläre Karzinome unterteilt.

Ebenso wie für das iCCA sind die einzigen beiden kurativen Therapieansätze für das pCCA die operative Tumoresektion und die Lebertransplantation (LTX) mit neoadjuvanter Chemotherapie. Zur präoperativen Planung und Entscheidungshilfe wird die Bismuth-Corlette-Klassifikation verwendet. Demnach umfasst die Resektion für die Typen I und II eine Entfernung der extrahepatischen Gallenwege und der Gallenblase sowie eine regionale Lymphadenektomie und Hepatojejunostomie mit Roux-Y-Anastomose. Bei Typ III erfolgt zusätzlich eine Hemihepatektomie der betroffenen Seite. Der Typ IV ist normalerweise nicht resektabel (Khan et al. 2012, Rizvi und Gores 2013). Größere Leberlappenresektionen oder Hemihepatektomien beinhalten jedoch ein hohes Risiko für eine postoperative Leberinsuffizienz, falls der verbleibende Leberanteil zu klein ist, um die notwendige Funktion auszuüben. Um dieser Komplikation Vorbeuge zu leisten, gibt es die Möglichkeit der präoperativen Venenembolisation des zu entfernenden Leberabschnitts. Dadurch steigt die Durchblutung im künftig verbleibenden Teil, wodurch das Restvolumen wachsen kann und letzten Endes eine Resektion doch noch ermöglicht wird (Khan et al. 2012, Rizvi und Gores 2013, Yao et al. 2014).

Tabelle 2.3: Kriterien für die LTX beim pCCA nach Rizvi und Gores (2013)

Kriterien für eine Lebertransplantation bei pCCA	
Diagnose eines Cholangiokarzinoms	
➤	Positive transluminale Biopsie
➤	Positive biliäre Spülzytologie
➤	Malignitätsverdächtige Stenose bei der ERCP mit einem CA 19-9-Wert >100 U/ml und/oder FISH-Polysomie
➤	Raumforderung in der Schnittbildgebung malignitätssuspekte Stenose in ERCP/MRCP
Tumorgroße	
➤	Radialer Tumordurchmesser von ≤ 3 cm
Tumor beschränkt auf Gallengangswege	
➤	Abwesenheit intrahepatischer oder extrahepatischer Metastasen
Irresektabilität	
➤	Nicht resektabler hilärer Tumor (oberhalb des Ductus cysticus)
➤	CCC bei PSC-Patienten

Als Kontraindikationen gelten eine kontralaterale oder beidseitige Gefäßummauerung, eine beidseitige Ausbreitung des Tumors bis zu den sekundären Gallengangsverzweigungen sowie Fernmetastasen. Eine lokale Lymphknotenbeteiligung, hingegen, schließt eine Operation nicht grundsätzlich aus (Rizvi und Gores 2013). Insgesamt liegt die 5-Jahresüberlebensrate nach operativer Resektion im Bereich von 11-41% (Khan et al. 2012, Rizvi und Gores 2013).

Die Durchführung einer Lebertransplantation ist an strenge Kriterien gekoppelt, welche vorher geprüft werden müssen. Diese sind in Tabelle 2.3 dargestellt. Für Patienten, welche die Vorgaben erfüllen, stellt die Lebertransplantation in Kombination mit einer neoadjuvanten Chemotherapie eine wertvolle Alternative zur operativen Resektion dar. In zwölf verschiedenen Transplantationszentren zeigte sich hier eine 5-Jahres-Überlebensrate von 56% (Rizvi und Gores 2013).

Aufgrund der anatomischen Lage stellt die Pankreatoduodenektomie (Operation nach Whipple) die operative Prozedur für Patienten mit einem dCCA dar. Die 5-Jahres-Überlebensraten betragen hierbei zwischen 27% und 37% (Khan et al. 2012). Die neoadjuvante Chemotherapie spielt nur eine untergeordnete Rolle (Rizvi und Gores 2013).

Palliative Gallendrainage

Für viele Patienten ist zum Zeitpunkt der Diagnose das Tumorstadium bereits so weit fortgeschritten, dass eine operative Behandlung nicht mehr möglich ist. Bei diesen Patienten gilt es vor allem die symptomatischen Beschwerden zu lindern und die Lebensqualität so hoch wie möglich zu halten. Hierbei ist es wichtig, eine längerfristige Einengung der Gallenwege zu vermeiden, da diese in einer Cholangitis und Leberinsuffizienz münden kann. Dazu stehen verschiedene Möglichkeiten einer suffizienten Drainage der Gallenflüssigkeit zur Verfügung. Als Mittel der Wahl hat sich aufgrund der hohen Erfolgsquote und dem niedrigen Risikoprofil die endoskopische Stentimplantation erwiesen. Eine Alternative dazu stellt die perkutane Drainage dar. Beide Verfahren haben ähnliche Erfolgsraten. Bei den Stents kann zwischen Plastik- und Metallstents, gecoverten und ungecoverten Stents gewählt werden. Zudem besteht die Möglichkeit einer einseitigen und einer beidseitigen Gallendrainage. Die Studienlage hierzu ist unterschiedlich und die Wahl des optimalen Stentingverfahrens daher umstritten. Bei Patienten mit einer voraussichtlichen Überlebenszeit von mehr als 4-6 Monaten werden jedoch eher Metallstents empfohlen. Falls beide genannten Drainageverfahren fehlschlagen sollten, gibt es noch die Option einer operativen Drainage mittels Bypassanlage zwischen Gallenwegen und Darm (Khan et al. 2012, Yao et al. 2014).

Chemotherapie

Bis vor einigen Jahren waren die Resultate der Chemotherapie beim CCC eher ernüchternd. Auf der Grundlage britischer Studien (ABC-01 und ABC-02) konnte sich jedoch seit 2010 eine neue Standardbehandlung für inoperable Gallenwegskarzinome etablieren. Diese besteht in einer Kombination aus Cisplatin und Gemcitabin. Es ließ sich neben einer höheren mittleren Überlebenszeit von 11,7 Monaten auch eine bessere Tumorkontrolle mit längeren progressionsfreien Intervallen nachweisen. Zudem konnte bei einigen Patienten in Form einer neoadjuvanten Therapie ein Downstaging erreicht werden, wodurch die Möglichkeit einer operativen Therapie gegeben war. Diese Resultate konnten in einer äquivalenten Studie in Japan bestätigt werden. Daher wird Patienten mit inoperablen CCCs in lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Stadien mittlerweile eine Chemotherapie mit Cisplatin und Gemcitabin empfohlen (Khan et al. 2012, Yao et al. 2014).

Für eine postoperative adjuvante Chemotherapie bestehen derzeit keine evidenzbasierten Empfehlungen. Ein möglicher Überlebensvorteil durch eine adjuvante Therapie mit Mitomycin C und 5-Fluorouracil muss noch genauer untersucht werden (Khan et al. 2012).

Radiotherapie

Derzeit bestehen keine evidenzbasierten Empfehlungen für den routinemäßigen Einsatz der Radiotherapie oder Radiochemotherapie als adjuvante Therapie oder bei inoperablen Tumoren. Ihre Rolle beschränkt sich aktuell auf die palliative Behandlung bei Metastasen oder unkontrollierten Blutungen (Khan et al. 2012). Bei palliativer Intention zeigte der Einsatz einen positiven Effekt auf die Überlebenszeit und Lebensqualität (Yao et al. 2014). Allerdings konnte in einigen Studien ein Benefit für die postoperative Radiotherapie bei Patienten mit einer R1-Situation gezeigt werden. Die Raten für das krankheitsfreie Überleben waren bei Patienten mit positivem Resektionsrand mit 21% doppelt so hoch wie bei alleiniger Resektion (Yao et al. 2014). Für die Radiochemotherapie ergaben sich vor allem in Form der neoadjuvanten Therapie vor Lebertransplantation signifikant höhere Überlebensraten und niedrigere Rezidivraten als bei alleiniger Transplantation (Yao et al. 2014).

Photodynamische Therapie

Bei der photodynamischen Therapie wird ein Laser genutzt, um in vivo vorher verabreichte Photosensibilisatoren zu aktivieren und freie Sauerstoffradikale zu erzeugen, welche die Tumorzellen zerstören sollen. Die Kombination dieses Verfahrens mit einem Gallengangsstenting oder einer Chemotherapie zeigte positive Effekte auf das Überleben in

der palliativen Situation. Zudem scheint es den Zeitraum der Durchlässigkeit von Metallstents zu verlängern (Yao et al. 2014). Trotzdem kann die photodynamische Therapie anhand der Datenlage noch nicht als Routineverfahren empfohlen werden (Khan et al. 2012).

Lokoregionäre Verfahren

Neuere Veröffentlichungen lassen vermuten, dass die Rolle lokoregionärer Verfahren in Zukunft bei der Behandlung intrahepatischer CCCs zunimmt. Hierbei handelt es sich vor allem um die transarterielle Chemoembolisation (TACE), die Radiofrequenzablation (RFA) und die transarterielle Radioembolisation mit Yttrium-90. Diese Verfahren werden bereits erfolgreich in der Behandlung des HCC und kolorektaler Lebermetastasen angewandt.

In einer retrospektiven Studie zeigte die TACE-Behandlung mit 12,2 Monaten eine signifikant längere Überlebenszeit als die alleinige supportive Therapie mit 3,3 Monaten, war allerdings mit einer höheren Toxizität verbunden. Eine weitere Studie ergab vor allem einen Überlebensvorteil für Patienten mit negativen prognostischen Faktoren (5-Jahres-Überlebensrate von 14% im Vergleich zu 0%). Einige kleinere Studien konnten zeigen, dass die perkutane, ultraschallgesteuerte RFA eine weitere potentiell wirksame Therapieoption für irresektable iCCA darstellt. In einer chinesischen Studie mit 18 Patienten (8 mit Primärtumor, 10 mit Rezidiven) konnten 92% der Tumorknoten erfolgreich beseitigt werden und es ergab sich eine 5-Jahresüberlebensrate von 30% (63% bei den Primärtumoren). Auch die Behandlung von 33 Patienten mit inoperablen iCCA mittels Radioembolisation mit Yttrium-90 ergab verlängerte Überlebenszeiten.

Um die Wirksamkeit dieser lokoregionären Verfahren endgültig einordnen zu können, werden jedoch weitere größere, prospektiv randomisierte Studien benötigt (Khan et al. 2012).

2.3 Somatostatin

Erstmals 1968 als hormonsekretionshemmendes Molekül beschrieben (Krulich et al. 1968), 1973 isoliert und charakterisiert (Brazeau et al. 1973) und 1977 von Pelletier et al. im Hypothalamus nachgewiesen (Pelletier et al. 1977), besitzt das Polypeptid Somatostatin eine Vielzahl von Funktionen und hat Einfluss auf multiple Organsysteme im menschlichen Organismus. Hierzu zählen unter anderem Gehirn, Magen, Hypophyse, exokrine und endokrine Anteile des Pankreas, Nieren, Nebennieren, Schilddrüse und Immunsystem (Patel und Srikant 1997). Diese Effekte wurden seither in verschiedensten Studien untersucht und nachgewiesen. Ebenso scheint es Zusammenhänge zwischen Veränderungen im Somatostatin-

Haushalt und verschiedenen neurologischen Erkrankungen, wie zum Beispiel M. Alzheimer, M. Parkinson und M. Huntington, zu geben (Olias et al. 2004).

Vorwiegend vom Hypothalamus sezerniert, bewirkt Somatostatin eine Hemmung wichtiger Hormonachsen. So hat es beispielsweise eine Schlüsselrolle bei der Sekretion von GH (growth hormone) inne (Olias et al. 2004). Durch die Hemmung der GH-Ausschüttung bewirkt es eine verminderte Produktion von TSH (thyreoid-stimulating hormone) und Prolaktin (Abdel-Rahman et al. 2014, Barnett 2003). Des Weiteren nimmt es eine wichtige Rolle im Gastrointestinaltrakt ein. Durch eine Regulation der Magensäureproduktion sowie eine Hemmung der Sekretion verschiedenster peripherer Hormone in Magen und Pankreas wie zum Beispiel Gastrin, Cholezystokinin, Glucagon, Sekretin, VIP (vasoactive intestinal peptide), GIP (gastric inhibitory polypeptide) und Insulin beeinflusst es in vielfältiger Weise die Funktion des Verdauungstrakts. Zudem kommt es durch eine Reduzierung des Blutflusses und eine Hemmung der endokrinen Pankreashormonsekretion zur Verlangsamung der Magen-Darm-Passage und verminderten Gallenblasenkontraktion (Lamberts et al. 1996). Weiterhin führt Somatostatin zu einer Relaxation glatter Muskelzellen im Magen-Darm-Trakt (Olias et al. 2004). Außerdem scheint das Peptid neben einer Hemmung der Zellproliferation einen fördernden Effekt auf die Einleitung der Apoptose zu besitzen (Barnett 2003).

Man unterscheidet zwei biologisch aktive Formen des Somatostatins (SST), welche durch unterschiedliche Spaltung eines Prä-Proteins entstehen: SST14 besteht aus 14 Aminosäuren, während SST28 am N-Terminus weitere 14 Aminosäuren trägt. Beide haben die gleiche Funktion und unterscheiden sich lediglich in ihrer Wirkstärke (Benoit et al. 1990). Sie werden parallel vom Hypothalamus ausgeschüttet (Barnett 2003). Über axoplasmatischen Transport gelangen sie zur Eminentia mediana und zu den Nervenendigungen des hypophysealen Gefäßsystems und erreichen schließlich den Hypophysenvorderlappen. Die Halbwertszeit des Somatostatins in der Blutzirkulation ist mit 1,5 bis 3 Minuten recht gering. Dies erfordert, dass sich die SST-produzierenden Zellen in der Nähe der Zielzellen befinden (Barnett 2003). Daher wird das Somatostatin-Gen in Neuronen des gesamten zentralen und peripheren Nervensystems und in endokrinen Zellen exprimiert (Patel und Srikant 1997).

2.3.1 Somatostatin-Rezeptoren

Bisher konnten sechs verschiedene Somatostatin-Rezeptoren (SSTR) identifiziert werden, von welchen fünf im menschlichen Organismus vorkommen: SSTR1, SSTR2A, SSTR3, SSTR4 und SSTR5 (Barbieri et al. 2013). Der Somatostatin-Rezeptor 2B hingegen konnte bisher nur in Nagetieren nachgewiesen werden (Fischer et al. 2008). Mittlerweile gibt es viele Studien,

die die Gewebeverteilung, Expression, Bindungsaffinität und Signaltransduktion der fünf Rezeptoren genauer untersucht haben (Li et al. 2005). Die Gene dieser fünf Rezeptoren sind auf fünf verschiedenen Chromosomen lokalisiert (14, 17, 22, 20 und 16) (Li et al. 2005, Patel 1997, Volante et al. 2008). Durch die gewebsspezifische Expression der 5 Rezeptoren werden die individuellen Funktionen des Somatostatins in den verschiedenen Organen ermöglicht (Barnett 2003). Außer dem Gen für den SSTR2 besitzen die proteincodierenden Sequenzen der Gene keine Introns (Barnett 2003). Durch alternatives Splicing entstehen die beiden Isoformen des SSTR2 mit unterschiedlicher Länge der zytoplasmatischen Domäne, wobei der SSTR2A den längeren und der SSTR2B den kürzeren Carboxyterminus besitzt (Barnett 2003, Li et al. 2005). Die Genexpression wird unter anderem durch die Ausschüttung von Steroiden, Schilddrüsenhormonen und Somatostatin selbst reguliert (Barnett 2003).

Alle Somatostatin-Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und bestehen typischerweise aus einer extrazellulären Domäne, welche die Ligandenbindungsstelle bildet, sieben Transmembrandomänen sowie einer intrazellulären Domäne, welche die Signaltransduktion vermittelt (Barnett 2003, Li et al. 2005, Patel und Srikant 1997, Volante et al. 2008). Die alpha-helikalen Transmembrandomänen bilden dabei je drei intra- und extrazelluläre Schleifen (Barnett 2003).

Alle Rezeptoren besitzen eine sehr vergleichbare Fähigkeit, die beiden natürlich vorkommenden aktiven Formen des Somatostatins, SST-14 und SST-28, mit hoher Affinität zu binden (Barbieri et al. 2013, Barnett 2003, Li et al. 2005). Dabei besitzt der SSTR5 eine etwas größere Präferenz für die Isoform SST-28, während die anderen Rezeptoren SST-14 stärker binden (Barnett 2003). Obwohl die Bindungsaffinität zum natürlichen Somatostatin sehr ähnlich ist, unterscheiden sich die verschiedenen Rezeptoren stark in der Bindungsfähigkeit synthetischer Somatostatine und von Somatostatinanaloga (SSA) (Barbieri et al. 2013, Li et al. 2005). Während hexapeptide (Lanreotid) und octapeptide (Octreotid) SSA eine ausgesprochen hohe Präferenz für die Rezeptoren SSTR2, 3 und 5 aufweisen, gilt dies nicht für den SSTR1 und den SSTR4 (Barnett 2003, Li et al. 2005). Allerdings existiert mit Pasireotid ein neuer Wirkstoff, der zusätzlich zu den oben genannten Rezeptoren auch eine Affinität für den SSTR1 aufweist (Auernhammer et al. 2012). Dies könnte im klinischen Alltag eine entscheidende Bedeutung für das therapeutische Vorgehen haben (Barnett 2003).

Auch wenn die Funktion und die Wirkweise der einzelnen Rezeptoren sich sehr ähneln, bestehen doch einige kleinere Unterschiede in der Bedeutung der verschiedenen Funktionen. Von den fünf Rezeptoren ist der SSTR2 der wohl häufigste Subtyp und kommt in zahlreichen Geweben vor. Er spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation endo- und exokriner Sekretion

und der Zellproliferation (Li et al. 2005). In vielen Studien konnte eine Hemmung des Zellwachstums und die Einleitung der Apoptose durch eine Stimulation des SSTR2 nachgewiesen werden. In Pankreaskarzinomen konnte dieser Effekt bei vorliegender Überexpression von SSTR2 sogar bei fehlender Anwesenheit von Somatostatin beobachtet werden (Fisher et al. 2002, Li et al. 2005, Raully et al. 1996). Ähnliche Funktionen (Auslösen der Apoptose sowie Wachstumshemmung) wurden für den SSTR3 belegt. Der SSTR5 ist ebenfalls ein wichtiger Faktor in der Regulation des Tumorgößenwachstums. Er kommt in einer Vielzahl von Geweben wie z.B. Pankreas, Dick- und Dünndarmmukosa, Herz und glatten Muskelzellen von Gefäßen vor. Über die genaue Funktion des SSTR4 ist im Gegensatz zu den anderen Rezeptoren bisher am wenigsten bekannt (Li et al. 2005).

Aufgrund der weitläufigen Verteilung der SSTR kommen einige davon parallel in den gleichen Geweben und sogar den gleichen Zellen vor. Dies führt sowohl zur Bildung von Homo- als auch Heterodimeren, was zu einer Veränderung und Beeinflussung der Wirkweise der jeweils beteiligten Rezeptoren führt. Die Heterodimerbildung erfolgt jedoch nicht zufällig, sondern nur in bestimmten Kombinationen. Der SSTR5 zum Beispiel bildet sehr häufig Heterodimere mit dem SSTR1, jedoch nicht mit dem SSTR4 (Barnett 2003, Li et al. 2005). Eine weitere häufige Interaktion besteht zwischen dem SSTR2A und dem SSTR3, wodurch eine funktionelle Inaktivierung des SSTR3 bewirkt wird (Barnett 2003, Volante et al. 2008). Das Vorhandensein dieser funktionell aktiven Homo- und Heterodimere ist entscheidend für das Verständnis der unterschiedlichen Signaltransduktionswege, die in den individuellen Zielzellen von den beiden SST-Subtypen aktiviert werden (Volante et al. 2008). Des Weiteren ist eine Heterodimerbildung nicht nur zwischen den einzelnen SSTR-Subtypen, sondern auch mit anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren möglich. So gibt es zum Beispiel Heterodimere aus dem SSTR5 und dem Dopaminrezeptor 2 sowie aus dem SSTR2A und dem μ -Opioidrezeptor (Barnett 2003).

2.3.1.1 Signaltransduktion

Die fünf Rezeptoren können das Zellwachstum durch die Einleitung verschiedener intrazellulärer Signaltransduktionswege vermindern (Pyronnet et al. 2008). Jeder SSTR-Subtyp vermittelt dabei unterschiedliche Wirkungen des Somatostatins (Volante et al. 2008). Der gemeinsame Effekt ist dabei die intrazelluläre Reduktion von cAMP (cyclischem Adenosin-Monophosphat) und von Kalzium, was zur Aktivierung von Proteinphosphatasen führt. Die Endstrecke der Signaltransduktion variiert dabei und ist abhängig von den beteiligten Rezeptoren und Liganden (Barnett 2003). Insgesamt sind dabei vier

Hauptmechanismen zu beobachten: (1) Eine intrazelluläre cAMP-Senkung durch eine Hemmung der Adenylatcyclase, (2) eine Aktivierung (mit nachfolgender Hyperpolarisation der Zelle) verschiedener Kalium- und spannungsabhängiger Kalziumkanäle, welche einen intrazellulären Kalziumabfall aufgrund eines sinkenden transmembranösen Kalziumeinstroms bewirken, (3) eine zusätzliche Beeinflussung von Kalzium- und Kaliumkanälen durch Aktivierung von Proteinphosphatasen und Serin/Threonin-Phosphatasen sowie (4) die Hemmung des Zellzyklus durch Aktivierung intrazellulärer Tyrosinphosphatasen (Barnett 2003, Volante et al. 2008). Dabei verursacht die tyrosinphosphatase-vermittelte Aktivierung von SSTR1 und SSTR2 vor allem die antimitotische Aktivität der Somatostatinanaloge, während die Aktivierung des SSTR5 durch Senkung des intrazellulären Kalziumlevels gleichzeitig eine Hemmung der Zellproliferation bewirkt (Volante et al. 2008). Der SSTR3 führt hingegen zu einer selektiven Apoptoseeinleitung. Die Wirkung wird daher auch als „zytotoxisch“ beschrieben (Barnett 2003, Volante et al. 2008). Einen zusätzlichen antiproliferativen Mechanismus stellt die direkte Hemmung der Freisetzung wachstumsfördernder Faktoren dar (Barnett 2003). Tabelle 2.4 gibt einen Überblick über die Beeinflussung der verschiedenen Signaltransduktionswege durch die einzelnen SSTR-Subtypen (Pyronnet et al. 2008).

Tabelle 2.4: Beeinflussung der verschiedenen Signaltransduktionswege durch die unterschiedlichen Somatostatin-Rezeptoren nach Pyronnet et al. (2008)

<i>Signaltransduktionswege</i>	<i>SSTR1</i>	<i>SSTR2</i>	<i>SSTR3</i>	<i>SSTR4</i>	<i>SSTR5</i>
<i>Adenylatcyclase</i>	↓	↓	↓	↓	↓
<i>Ca²⁺ - Kanäle</i>	↓	↓			↓
<i>K⁺ - Kanäle</i>	↓	↑	↑	↑	↑
<i>Phospholipase C</i>	↑	↑	↑	↑	↑/↓
<i>Phospholipase A2</i>	↓	↓		↑	
<i>Tyrosinphosphatasen</i>	↑	↑	↑	↑	↑
<i>Tyrosinkinasen</i>	↑	↑			
<i>Pi-3-Kinase/Akt</i>	↑	↑/↓		↑	
<i>Rho-Kinase</i>	↓				
<i>NO/cGMP</i>	↓	↑/↓	↓	↓	
<i>Na⁺/H⁺-Austausch</i>	↓		↓	↓/↑	
<i>MAP-Kinasen</i>	↓/↑	↓/↑	↓	↑	↓
<i>ERK</i>		↑		↑	
<i>p38</i>		↑			↑

Legende: SSTR = Somatostatin-Rezeptor, Pi-3 = Phosphoinositid-3, Akt = Proteinkinase B, NO = Stickstoffmonoxid, cGMP = zyklisches Guanosinmonophosphat, MAP = Mitogen-activated Protein, ERK = Extracellular-signal Regulated Kinases

2.3.2 Somatostatinanaloga

Aufgrund der zentralen Rolle von Somatostatin in der Regulation der Ausschüttung von GH und der zahlreichen weiteren Effekte im menschlichen Organismus erkannte man schon früh das Potential, diese Wirkmechanismen auch therapeutisch nutzen zu können. Das größte Problem bestand dabei in der recht kurzen Halbwertszeit des nativen Somatostatins, welche eine Therapie nur über eine kontinuierliche Gabe per Infusion ermöglichte. Daher wurden schon bald synthetische Analoga (SSA) entwickelt, die die gleichen Effekte und Wirkstärken bei längerer biologischer Halbwertszeit aufweisen sollten. Aus der Vielzahl von SSA setzte sich zunächst das Octapeptid SMS 201-995, besser bekannt als Octreotid, durch, welches mit einer Halbwertszeit von etwa 2 Stunden bei subkutaner Injektion schon deutlich über dem des nativen Somatostatins lag. In den folgenden Jahren kamen weitere SSA wie Lanreotid und Vapreotid zum klinischen Einsatz. Daher basieren die meisten der bisher veröffentlichten Erkenntnisse über die Wirksamkeit und den Erfolg einer SSA-Therapie auf diesen Präparaten (Samonakis et al. 2008).

Inzwischen ist jedoch auch erwiesen, dass die bisherigen SSA eine Art Selektivität bezüglich der Somatostatin-Rezeptoren aufweisen. Tabelle 2.5 verdeutlicht, dass die am häufigsten eingesetzten Präparate kaum auf Zellen wirken, die den SSTR1 oder den SSTR4 exprimieren. Zudem ist mittlerweile bekannt, dass die verschiedenen Somatostatin-Rezeptoren in manchen Geweben bevorzugt vorkommen, zum Teil aber auch in einigen Zellen coexprimiert werden. Diese neu gewonnenen Erkenntnisse stellen die bisherigen Ergebnisse von Studien zur Wirksamkeit von SSA in der Tumorthherapie in Frage. Eine Forschergruppe um Samonakis fordert daher zum Beispiel eine individualisiertere Therapie auf der Grundlage eines SSTR-Mappings, in welchem vor Therapiebeginn die Rezeptorexpression des Tumors untersucht werden soll. Dadurch könnte man bereits eher Patienten erkennen, welche durch die SSA-Therapie profitieren würden und anhand des vorliegenden SSTR-Mappings das passende Präparat verabreichen, um den bestmöglichen Therapieerfolg zu erzielen (Samonakis et al. 2008).

Tabelle 2.5: Rezeptorselektivität einiger Somatostatinanaloga (SSA) nach Scarpignato et al. (2001)

	<i>SSTR1</i>	<i>SSTR2</i>	<i>SSTR3</i>	<i>SSTR4</i>	<i>SSTR5</i>
<i>Somatostatin - 14</i>	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Somatostatinanaloga</i>					
<i>Octreotid</i>	0	++	+	0	+
<i>Lanreotid</i>	0	++	0	0	+++
<i>Vapreotid</i>	0	+	0	0	+++

Inzwischen wurde mit Pasireotid ein neues SSA entwickelt, welches neben seiner längeren Halbwertszeit von etwa 12 Stunden weitere Vorteile gegenüber den bisher verwendeten SSA aufweist. Hier ist vor allem das breitere Wirkspektrum an den SSTRs zu nennen, da es neben den Rezeptoren 2, 3 und 5 auch an den SSTR1 bindet (Schmid 2008). Daher laufen aktuell zahlreiche klinische Studien, welche einen eventuellen Vorteil bei der Behandlung von Tumorpatienten mit Pasireotid gegenüber der bisherigen SSA-Therapie zeigen sollen (Auernhammer et al. 2012).

2.3.2.1 Einsatz von Somatostatinanaloga

In den letzten Jahren hat sich die Methode der Peptidrezeptor-vermittelten Radionuklidtherapie (PRRT) vor allem in der Behandlung endokriner Tumoren etabliert. Als Voraussetzung für dieses Verfahren gilt das Vorhandensein von SSTRs im Tumorgewebe. Ein Radionuklid wird über einen Chelator an ein SSA gekoppelt, welches selektiv an die SSTRs bindet. Durch Invagination der Plasmamembran wird der Komplex aus Ligand und Rezeptor von der Zielzelle internalisiert und somit aufgenommen. Als Radionuklide kommen hier Betastrahler zum Einsatz, welche einen antiproliferativen Effekt auf die Zielzelle besitzen. Yttrium (^{90}Y), Lutetium (^{177}Lu) sowie Indium (^{111}In) sind hierbei gängige Radioisotope. Als Chelatoren kommen hauptsächlich DPTA (Diethylenetriaminpentaessigsäure) oder DOTA (1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure) zum Einsatz (Scarpignato und Pelosini 2001, Campana et al. 2013). Analog zur gezielten Radiotherapie stellt auch die SSTR-vermittelte Chemotherapie einen möglichen Behandlungsansatz dar. Hierbei werden SSA mit zytotoxischen Substanzen wie Methotrexat oder Doxorubicin konjugiert (Scarpignato und Pelosini 2001).

Mittlerweile finden SSA neben der Therapie von Tumorerkrankungen auch Anwendung in der Diagnostik mittels Positronenemissionstomographie (PET) und Somatostatin-Rezeptor-

Szintigraphie. Diese Verfahren werden vor allem bei neuroendokrinen Tumoren zur Lokalisation von vor allem kleineren Primärtumoren und Metastasen verwendet. Hierfür wird das SSA Octreotid mit Radionukliden gekoppelt. Hauptsächlich kommen hierfür Gamma-Strahler zum Einsatz. Durch eine Gamma-Kamera kann dann die selektive Aufnahme im Gewebe und somit auch die Rezeptordichte abgeschätzt werden. Gebräuchliche Radionuklide sind zum Beispiel Indium (^{111}In), Gallium (^{68}Ga), Kupfer (^{64}Cu), Technetium (^{99}Tc) oder Terbium (^{161}Tb) (Scarpignato und Pelosini 2001, Campana et al. 2013). Da die Rezeptordichte im Tumorgewebe entscheidend für den Erfolg der oben beschriebenen Therapieansätze ist, kann anhand der Szintigraphie-Ergebnisse auch eine Aussage zur erwarteten Wirksamkeit solcher Therapieverfahren gemacht werden (Khan et al. 2008).

2.3.3 Somatostatin-Rezeptor-Expression in Tumoren

Die Somatostatin-Rezeptoren sind, wie bereits erwähnt, über das natürliche Vorkommen in zahlreichen Geweben des menschlichen Organismus hinaus auch in einer Vielzahl von Tumoren präsent. Patel und Srikant veröffentlichten 1997 eine Zusammenfassung der Untersuchungen zu den Expressionshäufigkeiten der verschiedenen SSTR-Subtypen in unterschiedlichen Tumorarten, wie z.B. in Prolaktinomen, Insulinomen, Glukagonomen, Phäochromozytomen, Meningeomen, Gliomen sowie Karzinomen der Brust und Niere (Patel und Srikant 1997). Auffällig waren dabei jedoch die geringen Fallzahlen in den einzelnen Studien und die daraus resultierende Heterogenität der Ergebnisse.

Das Interesse an der Erforschung der SSTR-Expression stieg durch eine Reihe von Entwicklungen seit Beginn der 1980er Jahre. Zu diesen gehörte unter anderem die Erkenntnis, dass häufige solide Tumoren von Brust, Magen, Dickdarm, Pankreas, Lunge, Prostata und Eierstöcken eine hohe SSTR-Expression aufweisen. Des Weiteren konnte eine Verkleinerung von Tumoren der Hypophyse und des Intestinaltrakts durch eine Therapie mit dem SSA Octreotid beobachtet werden. Zudem trieben die Möglichkeit der bildgebenden Darstellung von SSTR-positiven Tumoren mittels in-vivo-Rezeptorszintigraphie sowie die selektive Ablation dieser mittels Radiorezeptorthherapie die Erforschung der SSTR-Expression in den verschiedenen Tumorentitäten weiter voran (Patel und Srikant 1997).

Mittlerweile ist durch zahlreiche Studien bekannt, dass vor allem neuroendokrine Tumore, wie Hypophysenadenome, endokrine Pankreastumore, gastrointestinale und Lungenkarzinoide, Paragangliome, Phäochromozytome, kleinzellige Bronchialkarzinome, Merkelzellkarzinome, Neuroblastome oder medulläre Schilddrüsenkarzinome, eine hohe SSTR-Expression aufweisen (Papotti et al. 2000, Papotti et al. 2001b, Papotti et al. 2001a,

Papotti et al. 2002, Reubi et al. 1992b, Reubi et al. 1992a, Reubi et al. 1994, Reubi et al. 1996, Sestini et al. 1996, Taboada et al. 2007, Ueberberg et al. 2005, Volante et al. 2008). Trotzdem wurde insgesamt eine starke Heterogenität der Expression der SSTR-Subtypen sowohl zwischen den verschiedenen Tumorarten als auch innerhalb einzelner Tumorstichproben beobachtet. Zusammenfassend ist dabei der SSTR2 als häufigster Subtyp beschrieben, während der SSTR4 am seltensten vorkommt (Volante et al. 2008).

Auch im Bereich der soliden und hämatologischen Karzinome zeigte sich in der Literatur eine große Variabilität bezüglich der SSTR-Expression. Zu den untersuchten epithelialen Karzinomen zählen Tumoren der Lunge (Papotti et al. 2000, Papotti et al. 2001b), der Brust (Papotti et al. 1989, Reubi et al. 2002, Vikic-Topic et al. 1995), der Niere (Vikic-Topic et al. 1995), des pankreatikobiliären Systems (Pilichowska et al. 2001, Zhao et al. 2002), der Leber (Dimitroulopoulos et al. 2002), des Kolons bzw. Rektums (Laws et al. 1997, Qiu et al. 2006), des Ovars (Hall et al. 2002), der Prostata (Dizeyi et al. 2002, Reubi et al. 1995) sowie das follikuläre Schilddrüsenkarzinom (Haslinghuis et al. 2001). Insgesamt war die SSTR-Expression jeweils abhängig vom klinischen Erscheinungsbild und der Gewebelokalisation (Volante et al. 2008). In einigen Tumorarten konnte ein antiproliferativer Effekt von SSA nachgewiesen werden. Auch im Bereich der malignen lymphatisch-hämatologischen Tumoren und der Thymome gibt es dazu bereits vielversprechende Ergebnisse (Ferone et al. 2001a, Ferone et al. 2001b, Lastoria et al. 1998, Lugtenburg et al. 2001).

2.3.4 Somatostatin-Rezeptor-Expression in hepatozellulären Karzinomen

Für die Expressionsraten der fünf Somatostatin-Rezeptoren in HCC ist es bisher nicht gelungen, ein einheitliches Bild zu schaffen. In der Literatur werden dazu recht unterschiedliche Zahlen angegeben. So ergab eine Studie von Blaker et al. (2004) Expressionsraten von 46% für den SSTR1, von 41% für den SSTR2, von 64% für den SSTR3, von 0% für den SSTR4 und von 75% für den SSTR5, wohingegen bei Verhoef et al. (2008) zum Beispiel eine höhere Expressionsrate für den SSTR2 mit 67% gefunden wurde (Blaker et al. 2004, Verhoef et al. 2008). In einer weiteren Studie von Koc et al. (2013) werden Expressionsraten von 76% für den SSTR1 und von 51% für den SSTR5 angegeben (Koc et al. 2013). Die Ursachen für diese Differenzen können zum einen in der fehlenden Standardisierung der Messmethoden liegen, zum anderen aber auch durch Expressionsunterschiede in verschiedenen Tumorstadien oder durch Unterschiede in der Ätiologie und dem histopathologischen Subtyp des HCCs bedingt sein (Abdel-Rahman et al. 2014). Insgesamt lässt sich aufgrund der vorliegenden Literaturdaten aber sagen, dass die

Somatostatin-Rezeptoren offensichtlich in einem klinisch bedeutsamen Rahmen in HCCs exprimiert werden und somit einen möglichen diagnostischen oder therapeutischen Ansatzpunkt bilden könnten. Aus diesem Grund gab es bisher eine Reihe präklinischer und klinischer Studien zur Evaluation der SSTR-Expression in HCCs hinsichtlich der klinisch-prognostischen Aussagekraft (Abdel-Rahman et al. 2014).

Die präklinischen Studien zeigten einen anti-proliferativen Effekt von menschlichem Somatostatin (Chou et al. 1987) und von Somatostatinanaloga (Chen et al. 2001, Liu et al. 2004) sowie eine Reduktion der Invasivität von HCC-Zelllinien, die mit Somatostatinanaloga behandelt wurden (Reynaert et al. 2004). Des Weiteren konnte ein wachstumshemmender Effekt von Octreotid auf hepatozelluläre Tumore (Hua et al. 2005) sowie eine hemmende Wirkung von Somatostatinanaloga auf die metastatische Streuung (Jia et al. 2009) bei Mäusen nachgewiesen werden. Diese präklinischen Ergebnisse gaben Anlass zur Einleitung einer Reihe klinischer Studien (Abdel-Rahman et al. 2014).

Die Ergebnisse der bisherigen klinischen Studien zeigen ein eher inhomogenes Bild. Liu et al. (2013) untersuchten die Expression des SSTR2 und des SSTR5 bei Patienten mit einem HBV-assoziierten HCC im Frühstadium (Liu et al. 2013). Diese Patienten wurden dann mit Octreotid vorbehandelt und anschließend operativ therapiert. Zudem erfolgte die Einteilung in eine „hochexpressive“ und „niedrigexpressive“ Gruppe. Der Vergleich beider Gruppen ergab eine niedrigere Rezidivrate und ein höheres medianes krankheitsfreies Überleben für Patienten, die eine höhere SSTR-Expression aufwiesen. Auch Borbath et al. (2012) berichteten über einen Fall eines metastasierten HCC mit SSTR2-Überexpression, bei dem die Behandlung mit Lanreotid eine teilweise Regression und ein über 3 Jahre progressionsfreies Überleben sicherte (Abdel-Rahman et al. 2014, Borbath et al. 2012). In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluss einer TACE-Behandlung in Kombination mit unfraktioniertem Heparin und Octreotid gegenüber Heparin allein auf die extrahepatische Krankheitsentwicklung untersucht. Es zeigte sich eine signifikant verminderte Inzidenzrate an Metastasen für die Kombinationsbehandlung (Jia et al. 2012). Allerdings war diese Studie nicht randomisiert und machte keine Angaben zur SSTR-Expression. Diesen positiven Ergebnissen steht z.B. eine französische Studie von Barbare et al. (2009) gegenüber, in welcher beim Vergleich zwischen der Octreotid-Behandlung und Placebo keine Unterschiede im progressionsfreien Überleben festzustellen waren (Barbare et al. 2009). Das mediane Gesamtüberleben war mit 7 Monaten in der Kontrollgruppe sogar noch höher als in der Interventionsgruppe mit 6,5 Monaten. Allerdings gab es auch hier keine Angaben zur SSTR-Expression der Tumoren. Auch andere Studien zeigten negative Ergebnisse. So war das

medianes Überleben von Patienten mit fortgeschrittenem HCC in einer Untersuchung von Verset et al. (2007) bei einer Kombinationstherapie von Tamoxifen und Octreotid nur halb so lang wie bei alleiniger Tamoxifen-Therapie (Verset et al. 2007). Auch die Behandlung mit einer Kombination aus Sorafenib und Octreotid erwies sich bei nur 10% der Studienteilnehmer als positiv, während 66% der Patienten keine Veränderung und 34% sogar eine Tumorprogression zeigten (Prete et al. 2010). 2011 fassten Ji et al. die bisherigen Studien in Form einer Metaanalyse zusammen. Von 11 randomisierten, kontrollierten Studien mit insgesamt 802 Patienten wurden 9 in die Metaanalyse eingeschlossen. Während in der gekoppelten Auswertung der 4 Studien aus westlichen Ländern keine signifikanten Unterschiede für das 6-monatige, 12-monatige und 24-monatige Überleben zwischen der Octreotid-Gruppe und der Kontrollgruppe gefunden werden konnten, zeigten die 5 Studien aus China ein signifikant höheres 6- und 12-Monatsüberleben der Patienten, die mit Octreotid behandelt wurden, im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Überlebensrate nach 24 Monaten war ebenso höher, allerdings ohne Signifikanz. Allerdings wurde auch hier in nur einer Studie eine Angabe über die SSTR-Expression gemacht, weshalb noch mehr Untersuchungen zu diesem möglichen prädiktiven Marker notwendig sind (Abdel-Rahman et al. 2014, Ji et al. 2011).

2.3.4 Somatostatin-Rezeptor-Expression in cholangiozellulären Karzinomen

Bisher gibt es nur sehr wenige veröffentlichte Studien zum Vorkommen von Somatostatin-Rezeptoren in cholangiozellulären Karzinomen. Daher ist die Datenlage hierzu sehr begrenzt. In einer chinesischen Studie untersuchte die Arbeitsgruppe Zhao et al. 2002 sowohl die mRNA-Expressionsrate mittels RT-PCR als auch in vitro- und in vivo-Effekte von Somatostatinanaloga (Octreotid) in vier verschiedenen humanen CCC-Zelllinien. Dabei konnte jedoch lediglich das Vorkommen von mRNA des SSTR2 in allen vier Zelllinien nachgewiesen werden. Die anderen SSTR konnten nicht identifiziert werden. Allerdings konnte eine signifikante Proliferationshemmung durch Octreoid in allen Zelllinien nachgewiesen werden, welche jedoch eher durch eine Beeinflussung des Übergangs von der G₀- in die G₁-Phase des Zellzyklus als durch eine Induktion von Apoptoseprozessen hervorgerufen wurde (Zhao et al. 2002).

2.4 Chemokine

Seit der Entdeckung der Chemokine CXCL8 (IL-8) und CCL2 in den späten achtziger Jahren gab es eine rasante Zunahme bei der Entdeckung immer weiterer Gruppen von Chemokinen (Zlotnik und Yoshie 2012). Mittlerweile bilden sie die größte Gruppe innerhalb der Familie der Zytokine (Fernandez und Lolis 2002).

Chemokine stellen eine Gruppe relativ kleiner Proteine zwischen 8 und 17 kDa dar, welche durch eine unterschiedliche Anordnung von Cysteinresten im N-Terminus klassifiziert werden (Chensue 2001, Fernandez und Lolis 2002). Basierend auf diesen strukturellen Unterschieden im Molekül werden die Chemokine in vier Subgruppen eingeteilt: CXC, CC, (X)C und CX3C, wobei das „C“ für die Aminosäure Cystein steht und das „X“ für eine beliebige andere Aminosäure (Balkwill 2012, Chensue 2001, Zlotnik und Yoshie 2012). Innerhalb der CXC-Subgruppe kann man zudem, abhängig vom Vorhandensein bzw. dem Fehlen eines bestimmten Aminosäuretripletts (Glu-Leu-Arg), welches dem ersten Cysteinrest in der Primärstruktur vorangeht, weiter zwischen dem ELR- und dem non-ELR-Typ differenzieren (Chensue 2001, Zlotnik und Yoshie 2012).

Das Wort „Chemokin“ leitet sich aus der ursprünglich angenommenen chemotaktischen Funktion der Proteine ab. Diese Chemotaxis beinhaltet die Fähigkeit der Chemokine, die Bewegung von Zellen entlang eines Konzentrationsgradienten während einer Entzündungsreaktion zu lenken (Chensue 2001). Durch die Weiterentwicklung und Verbesserung der Analysemethoden konnten im Laufe der Jahre immer weitere Chemokine identifiziert werden (Zlotnik und Yoshie 2012). Zudem sind heute zahlreiche weitere Funktionen der Chemokine bekannt. So haben sie einen Einfluss auf die Organentwicklung, Angiogenese, Angiostase, Leukozytenrezirkulation sowie auf immunregulatorische Prozesse (Chensue 2001).

Diese fortschreitenden Erkenntnisse bedingten auch eine Aktualisierung der Nomenklatur der Chemokine. Neben der oben genannten Einteilung nach überwiegend strukturellen Aspekten bestehen mittlerweile auch Klassifikationen, die eher auf funktionellen Eigenschaften beruhen (Moser und Willmann 2004, Zlotnik und Yoshie 2012). Grundlegend kann man dabei zwischen inflammatorischen und homöostatischen Chemokinen unterscheiden. Erstere werden vor allem im Rahmen von Entzündungsprozessen ausgeschüttet und sind vor allem für die Migration von Leukozyten zum entzündeten oder verletzten Gewebe verantwortlich (Fernandez und Lolis 2002, Zlotnik und Yoshie 2012). Zudem aktivieren sie die Zellen zur Initiierung einer Immunantwort und des Wundheilungsprozesses (Fernandez und Lolis 2002).

Zur Gruppe der inflammatorischen Chemokine gehören auch die oben genannten CXC-Chemokine vom ELR- bzw. non-ELR-Typ, welche sich in ihrer Funktion stark unterscheiden. Chemokine vom ELR-Typ wirken angiogen, während solche vom non-ELR-Typ angiostatisch wirken (Zlotnik und Yoshie 2012). Die Gruppe der homöostatischen Chemokine wird vorwiegend gleichmäßig ausgeschüttet und hat unterschiedlichste Funktionen. Unter anderem lenken sie die Wanderung von Lymphozyten zu lymphatischen Geweben und spielen eine große Rolle in der Organisation des Immunsystems (Fernandez und Lolis 2002, Zlotnik und Yoshie 2012). Einige Chemokine weisen Eigenschaften sowohl der inflammatorischen als auch der homöostatischen Gruppe auf und werden daher als „dual-function chemokines“ bezeichnet (Zlotnik und Yoshie 2012).

2.4.1 Chemokinrezeptoren

Auch die Chemokinrezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) (Balkwill 2012, Chensue 2001, Zlotnik und Yoshie 2012). Sie bestehen aus sieben hydrophoben Transmembrandomänen mit jeweils drei intrazellulären und drei extrazellulären hydrophilen Schleifen (Chensue 2001, Fernandez und Lolis 2002). Gemäß der strukturellen Einteilung ihrer hauptsächlich bindenden Liganden, werden auch die Rezeptoren in vier Untergruppen eingeteilt (Fernandez und Lolis 2002, Zlotnik und Yoshie 2012). Insgesamt konnten bisher 18 verschiedene klassische chemotaktische Rezeptoren in Mensch und Maus identifiziert werden. Hinzu kommen fünf atypische nicht-chemotaktische Chemokinrezeptoren (Zlotnik und Yoshie 2012).

Vor allem die Rezeptoren inflammatorischer Chemokine scheinen häufig eine Vielzahl von Liganden zu besitzen und einige Liganden teilen sich wiederum mehrere Rezeptoren (Nomiyama et al. 2011, Zlotnik und Yoshie 2012). Des Weiteren gibt es Chemokine, die als natürlicher Antagonist andere Ligand-Rezeptor-Interaktionen blockieren. Zudem können die Chemokinrezeptoren auch andere Liganden außerhalb der Chemokinfamilie binden; so interagiert zum Beispiel acPGP (N-acetyl-Pro-Gly-Pro) mit dem CXCR1 und dem CXCR2 oder MIF (Macrophage migration inhibitory factor) mit dem CXCR2 und dem CXCR4 oder extrazelluläres Ubiquitin mit dem CXCR4 (Zlotnik und Yoshie 2012).

Homöostatische oder „dual function“-Chemokinrezeptoren besitzen hingegen nur ein begrenztes Ligandenspektrum. Die meisten binden nur ein bis zwei Liganden und dienen dabei ganz spezifischen Funktionen (Zlotnik und Yoshie 2012).

Die 5 atypischen Chemokinrezeptoren binden eine Vielzahl von Chemokinen und unterscheiden sich vor allem durch die Eigenschaft, einen Einfluss auf die Verfügbarkeit und

die Funktion von sowohl inflammatorischen als auch homöostatischen Chemokinen zu besitzen (Zlotnik und Yoshie 2012).

2.4.1.1 Signaltransduktion

Die Aktivierung von Chemokinrezeptoren beginnt mit der extrazellulären Bindung eines Liganden, was in einem Austausch von GDP für GTP an der α -Untereinheit des G-Proteins resultiert, wodurch das trimere G-Protein in eine α - und eine β/γ -Untereinheit zerfällt. Letztere aktiviert Enzyme wie die Phospholipase C und die Phosphoinositid-3-Kinase, welche wiederum eine Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) bewirkt. Die Freisetzung von IP_3 resultiert in einem erhöhten Einstrom von Kalziumionen, während DAG die Proteinkinase C aktiviert. Die folgende Kaskade von Phosphorylierungen, in welche verschiedene Kinasen und GTPasen involviert sind, führt zur Umsetzung der zellulären Funktionen der Chemokine (Chensue 2001).

2.4.2 CXCR4 und CXCL12

Das Chemokin CXCL12 – auch als SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) bekannt – ist eines der homöostatischen Chemokine und bindet an die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 (Teicher und Fricker 2010). Für den CXCR4 ist das CXCL12 der einzige bekannte natürliche Ligand (Wong und Korz 2008). Bisher werden sechs verschiedene Isoformen des CXCL12 beschrieben: CXCL12 α , CXCL12 β , CXCL12 γ , CXCL12 δ , CXCL12 ϵ und CXCL12 ϕ . Die am besten erforschten sind dabei die Isoformen α und β (Wong und Korz 2008). Erstere ist die vorherrschende Isoform, die von Stromazellen des Knochenmarks und von endothelialen Zellen sezerniert wird und in fast allen Organen nachweisbar ist (Lombardi et al. 2013). Während die α -Isoform stark der Proteolyse im Blut ausgesetzt ist, zeigt die β -Form eine gewisse Resistenz gegen den blutabhängigen Zerfall. Sie stimuliert die Angiogenese und ist daher vor allem in stark vaskularisierten Geweben von Leber, Niere und Milz zu finden (Lombardi et al. 2013).

Wie viele homöostatische Chemokine wird auch das CXCL12 konstitutiv exprimiert (Teicher und Fricker 2010). Es hat eine tragende Rolle im Homing-Prozess von hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks inne und vermittelt das Überleben und die Proliferation humaner und muriner Vorläuferzellen (Lombardi et al. 2013). Allerdings besteht ebenso eine Assoziation zwischen der Sekretion und einer Gewebsschädigung, wie sie zum Beispiel durch

einen Herzinfarkt, periphere Ischämien, toxische Leberschäden, starke Blutungen oder aber auch eine Ganzkörperbestrahlung oder eine Chemotherapie hervorgerufen werden kann (Teicher und Fricker 2010).

Der Chemokinrezeptor CXCR4 hat vor allem in seiner Funktion als Co-Rezeptor beim Eintritt von HI-Viren, welche auf CD4-positive T-Zellen abzielen, erheblich Aufmerksamkeit auf sich gezogen. Er ist in einem breiten Spektrum von Geweben vertreten und wird von einer Vielzahl von Zellen exprimiert, zu denen unter anderem Lymphozyten, hämatopoetische Stammzellen, endotheliale und epitheliale Zellen sowie auch Tumorzellen gehören (Lombardi et al. 2013, Teicher und Fricker 2010). Mittlerweile ist bekannt, dass durch die Bindung von CXCL12 an den CXCR4 eine Reihe von intrazellulären Signaltransduktionswegen in Gang gesetzt wird, welche Auswirkungen auf die Chemotaxis, die Proliferation und das Überleben von Zellen, den intrazellulären Kalziumhaushalt und die Gentranskription haben. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass diese Wirkmechanismen essentiell für das Wachstum, die Hämatopoese, die Entwicklung von Organen und die Gefäßbildung sind (Lombardi et al. 2013). Allerdings spielt die CXCL12/CXCR4-Interaktion auch eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung maligner Tumoren und vor allem der Ausbildung von Metastasen (Lombardi et al. 2013, Teicher und Fricker 2010).

2.4.3 CXCR4-Expression in Tumoren

Chemokine sind dafür bekannt, die Zellwanderung, insbesondere die von Leukozyten, während eines Entzündungsprozesses zu fördern. Es wird angenommen, dass ein langwieriger Entzündungsprozess die Entstehung von Tumoren durch Schaffen eines idealen Milieus für die Entwicklung von Tumorzellen erleichtert. Durch die Beeinflussung der Angiogenese sowie durch direkte Effekte auf das Wachstum, die Invasivität und die Metastasierung von Tumoren scheinen Chemokine zudem eine entscheidende Rolle für deren Genese zu spielen (Lombardi et al. 2013).

Die CXCL12/CXCR4-Achse ist dabei vor allem an der Ausbildung von Metastasen beteiligt, indem sie die Gefäßbildung und Zellmigration von Tumorzellen in das metastasierte Gewebe fördert. Ein entscheidender Bestandteil ist dabei die Hypoxie. Durch eine geringere Sauerstoffkonzentration im Tumorgewebe wird HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α) produziert, welcher die Expression von CXCR4 steigert. Unter physiologischen Bedingungen wird die Produktion von HIF-1 α durch das von-Hippel-Lindau-Protein unterdrückt und somit die CXCR4-Expression reguliert (Lombardi et al. 2013, Teicher und Fricker 2010).

2.4.4 CXCR4-Expression in hepatozellulären Karzinomen

Das CXCL12 und der CXCR4 sind von allen in HCC vorkommenden Chemokinen und deren Rezeptoren die wahrscheinlich am besten belegten und untersuchten (Ehling und Tacke 2015, Liang et al. 2015). Eine Studie von Li et al. 2007 zeigte eine erhöhte Expression des CXCL12 und des CXCR4 in HCC, zum einen gegenüber normalem und angrenzendem Lebergewebe, aber auch im Vergleich zu Leberadenomen und zirrhotischem Gewebe (Ghanem et al. 2014, Huang und Geng 2010, Li et al. 2007). Einige Studien konnten belegen, dass eine übermäßige Expression des CXCL12 oder des CXCR4 wahrscheinlich mit einer Reihe tumorspezifischer Charakteristiken vergesellschaftet ist (Liang et al. 2015).

Die Aktivierung von CXCR4-exprimierenden Zellen wie Lymphozyten, Endothelzellen oder auch HCC-Zellen selbst durch das CXCL12 erfolgt dabei sowohl auf dem autokrinen als auch auf dem parakrinen Weg (Ehling und Tacke 2015). Die CXCR4-Expression in HCC kann durch verschiedene Faktoren noch zusätzlich getriggert werden. Zu diesen Faktoren zählen u.a. einige Matrix-Metalloproteinasen (MMP-2, MMP-9 und MMP-10) sowie TGF- β (transforming growth factor- β) und oxidativer Stress (Ehling und Tacke 2015, Liang et al. 2015).

Verschiedene Studien stellten eine Korrelation zwischen einer hohen CXCR4-Expression in HCC-Zellen und deren Proliferation, Migration, Überlebensdauer und Fähigkeit zur Invasion fest (Ehling und Tacke 2015, Huang und Geng 2010, Sutton et al. 2007). Zudem hat das Vorhandensein von CXCL12 bzw. CXCR4 einen fördernden Effekt auf die Gefäßbildung in HCC. Während in Zelllinien mit hohem Vorkommen von CXCL12 eine erhöhte Ausschüttung von VEGF (vascular endothelial growth factor) zu beobachten war, konnte durch den CXCR4-Antagonisten AMD3100 eine Abnahme der Gefäßdichte und -größe verzeichnet werden (Liang et al. 2015).

Zudem stehen der CXCR4 und sein Ligand in Zusammenhang mit einer vermehrten lymphogenen und vor allem auch hämatogenen Metastasierung und einem verringerten Überleben der Patienten (Ehling und Tacke 2015, Huang und Geng 2010, Lombardi et al. 2013). Dies scheint vor allem auf dem Einfluss von CXCL12 auf die Migration von Tumorzellen zu beruhen (Ghanem et al. 2014, Huang und Geng 2010).

2.4.5 CXCR4-Expression in cholangiozellulären Karzinomen

Trotz der steigenden Inzidenz von cholangiozellulären Karzinomen gibt es nur sehr wenige Studien zum Einfluss von Chemokinen auf die Entwicklung von Gallengangskarzinomen. Die wenigen neueren Veröffentlichungen zeigen jedoch eine erhöhte CXCR4-Expression in Proben von CCCs und in entsprechenden Zellkulturen (Gentilini et al. 2012). Diese lässt vermuten, dass die CXCL12/CXCR4-Achse eine entscheidende Rolle auch im Wachstumsprozess von CCCs spielen könnte (Ehling und Tacke 2015).

2.5 Der Proliferationsmarker Ki-67

Ausgehend von der ursprünglichen Beschreibung des Ki-67 im Rahmen der Immunisierung von Mäusen mit Nuklei von Zellkulturen aus Hodgkin-Lymphomen, in welcher es zunächst als Antigen zum zugehörigen Antikörper deklariert wurde (Gerdes et al. 1983), hat sich die Charakterisierung des Proteins im Laufe der Jahre verändert (Scholzen und Gerdes 2000). Mittlerweile ist bekannt, dass die Expression des humanen Ki-67-Proteins in direktem Zusammenhang mit der Zellproliferation und den Phasen des Zellzyklus steht (Li et al. 2015, Scholzen und Gerdes 2000). Während es in sämtlichen aktiven Phasen (G_1 , S, G_2 und Mitose) auftritt, wird es in der G_0 -Phase nicht exprimiert (Scholzen und Gerdes 2000, Vilar et al. 2007). Dadurch ist das Ki-67 ein sehr guter Anhaltspunkt für Aussagen über den Grad der Aktivität der Zellteilung in den jeweiligen Zellkulturen. Daher eignet es sich auch, um Aussagen über das Ausmaß der Proliferation von verschiedenen Tumoren und somit über deren Aggressivität und Wachstumsrate zu treffen, welche entscheidende Kriterien für klinische Prognosen darstellen. Allerdings gibt es auch hier Grenzen in der Aussagekraft, da die Positivität von Ki-67 nicht zwangsläufig damit gleichzusetzen ist, dass eine Zellteilung stattfindet, da Zellen ebenso den aktiven Zellzyklus verlassen und in ein Ruhestadium übergehen können. Es wird also nur die Fähigkeit einer Zelle zur Proliferation abgebildet (Scholzen und Gerdes 2000).

Trotz allem ergaben klinische Studien direkte Korrelationen zwischen der Ki-67-Expression und klinischen Tumorstadien, der Metastasierungsrate und dem Überleben der Patienten. Zudem wird sie bei der pathologischen Bewertung von Biopsien als Proliferationsmarker herangezogen, da für viele Tumorentitäten eine signifikant erhöhte Expression gegenüber dem Normalgewebe nachgewiesen werden konnte (Li et al. 2015). Der Grad der Korrelation mit der Proliferationsaktivität und somit die prognostische Aussagekraft der Ki-67-Expression ist dabei jedoch für jede einzelne Tumorentität unterschiedlich zu bewerten. Für das

hepatozelluläre Karzinom gibt es zahlreiche Studien zu dieser Fragestellung, die jedoch zu unterschiedlichen Ergebnissen gekommen sind. Eine Metaanalyse dieser Studien von Luo et al. 2015 zeigt jedoch ein eindeutiges Ergebnis und unterstreicht den diagnostischen und prognostischen Wert des Ki-67 auch beim HCC (Luo et al. 2015).

3. Zielsetzung dieser Arbeit

Sowohl die hepatozellulären als auch die cholangiozellulären Karzinome haben trotz optimaler Therapie eine schlechte Prognose, da sie zumeist erst in späten Stadien diagnostiziert werden, wodurch der Einsatz von kurativen Therapieoptionen (wie z.B. der operativen Resektion) nur eingeschränkt möglich ist. Da zudem in fortgeschrittenen Tumorstadien von HCCs und CCCs die Wirkung der weiteren zur Verfügung stehenden Behandlungsmethoden immer noch begrenzt ist, wurde in den letzten Jahren die Suche nach weiteren, vor allem nicht zytotoxischen, Therapieansätzen intensiviert. Hierbei richtete sich das Augenmerk neben der Hormontherapie auch immer mehr auf die Erforschung von Somatostatinanaloga (SSA).

Im Rahmen eines größeren Forschungsprojektes zur Untersuchung verschiedener Tumorentitäten auf das Vorhandensein von Somatostatin-Rezeptoren und des Chemokinrezeptors CXCR4 soll diese Arbeit einen Beitrag durch Bestimmung dieser Rezeptoren in HCCs und CCCs leisten. Hierzu wurden Tumorproben von Patienten mit einem HCC und von Patienten mit einem CCC immunhistochemisch angefärbt und lichtmikroskopisch mit Hilfe eines Scores ausgewertet. Die Ergebnisse wurden schließlich im Zusammenhang mit den klinischen Patientendaten ausgewertet und anschließend mit Ergebnissen anderer Studien zu diesem Thema verglichen.

Für eine Vielzahl von Tumoren (v.a. neuroendokrine Neoplasien) ist die Überexpression der verschiedenen SSTRs bereits erwiesen. Daher wurden Therapieansätze in Form von SSA entwickelt, deren Wirksamkeit ebenfalls Ziel aktueller Studien ist. Allerdings bestehen weder standardisierte Vorgaben zur Ermittlung der SSTR-Expression, noch einheitliche Therapieschemata bezüglich der Tumorthherapie mit SSA. Die bisher veröffentlichten Studien zur Wirksamkeit von SSA bei Patienten mit einem HCC zeigen sehr kontroverse Ergebnisse, während solche Studien für Patienten mit einem CCC kaum existieren. Daher soll die vorliegende Arbeit auch einen Beitrag zur besseren Einordnung der potentiellen Wirksamkeit verschiedener SSA bei diesen beiden Tumorentitäten leisten, um eventuell zusätzliche Therapieoptionen daraus abzuleiten bzw. die bestehenden zu optimieren.

Analog zur SSTR-Expression wird in der Literatur eine vermehrte Expression des CXCR4 in unterschiedlichen Tumorentitäten beschrieben, welche als weiterer Ansatz für die Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten in Frage kommt. Da einige Studien eine erhöhte CXCR4-Expression in HCCs im Vergleich zu gesundem Lebergewebe beschrieben

haben und es für die Expression in CCCs bisher kaum Untersuchungen gibt, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch die CXCR4-Expression in diesen beiden Tumorentitäten mit erfasst werden, um weitere Aufschlüsse über eine mögliche Eignung des CXCR4 als neue Zielstruktur für die Diagnostik und Therapie auch von HCCs oder CCCs zu erhalten.

4. Material und Methodik

4.1 Patientendaten und -proben

Vom Labor für Pathologie und Zytologie des Zentralklinikums Bad Berka wurden 56 Tumorproben von 18 Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom, 43 Präparate von 11 Patienten mit einem cholangiozellulären Karzinom sowie 6 Gewebeproben von 2 Patienten mit einer fokalen nodulären Hyperplasie zur Verfügung gestellt. Diese waren in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die abweichenden Angaben zwischen der Anzahl von Präparaten und der Patientenzahl erklären sich dadurch, dass es zu vielen Patienten mehrere Tumorproben gab. Dabei handelte sich es um Biopsien, Schnellschnitte, Tumorsektate und Anschnitte von Lymphknoten.

4.1.1 Votum der Ethikkommission

Für dieses Forschungsvorhaben sowie für die dafür notwendige Verwendung der Patientendaten liegt ein befürwortendes Votum der zuständigen Ethikkommission der Landesärztekammer Thüringen vor.

4.1.2 Geräte und Materialien zur Probenaufbereitung

Materialien zur Herstellung der Gewebeschnitte

Objektträger SuperFrost® plus	Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland
-------------------------------	---

Geräte zur Herstellung der Gewebeschnitte

Rotationsmikrotom HM 335 E	Microm, Walldorf, Deutschland
Streckbad	Medax Nagel GmbH, Kiel, Deutschland
Wasserbad	Memmert, Schwabach, Deutschland

4.2 Immunhistochemie

Alle 105 Präparate wurden immunhistochemisch auf die Expression der folgenden sechs Antigene hin untersucht: SSTR1, SSTR2A, SSTR3, SSTR4, SSTR5, CXCR4. Zudem wurde zu jedem Schnitt eine Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung angefertigt. Des Weiteren erfolgten immunhistochemische Färbungen zur Darstellung der Ki-67- und CD34-Expression.

4.2.1 Materialien und Gerätschaften für die Immunhistochemie

Substanzen und Chemikalien

3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)	BioGenex Laboratories, Fremont, CA, USA
Ammoniak-Lösung 25%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Citronensäure-Monohydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DePeX	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eosin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol 99,8 %	Echter Nordhäuser Spirituosen GmbH, Nordhausen, Deutschland
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mayer's Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Mowiol 4-88	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumcitrat-Monohydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Rinderserumalbumin (RSA)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Salzsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Triethylendiamin (DABCO)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trometamol (TRIS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Gerätschaften

Analysenwaage A200S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Färbekästen (Glas)	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Glas-Färbegestelle	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Magnetrührer	Schott Instruments, Mainz, Deutschland
Mikroskop	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Mikrowelle CB 1271	Bomann, Kempen, Deutschland

pH-Meter pH 211

Hanna Instruments, Kehl, Deutschland

Shandon Coverplates™

Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Shandon Sequenza®-Färbesystem

Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Lösungen/Puffer

PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung, pH 7,4)

NaCl 8,18 g

Na₂HPO₄ 1,77 g

KCl 0,20 g

KH₂PO₄ 0,24 g

auf 1000 ml Aqua bidest.

PBS/1% RSA (Rinderserumalbumin)

PBS 495 ml

Rinderserumalbumin 5 g

Citratpuffer-Stammlösung A (0,1 M)

Zitronensäure 21,01 g

auf 1000 ml Aqua bidest.

Citratpuffer-Stammlösung B (0,1 M)

Natriumcitrat 29,41 g

auf 1000 ml Aqua bidest.

Citratpuffer (0,01 M, pH 6,0)

Aqua bidestillata 900 ml

Stammlösung A 18 ml

Stammlösung B 82 ml

Ammoniakwasser

Aqua bidestillata 250 ml

Ammoniak 25% 1,4 ml

0,3 % Wasserstoffperoxid-Methanol-Lösung

Methanol 600 ml

Wasserstoffperoxid 30% 6 ml

Färbelösung, 10 ml (3-Amino-9-Ethylcarbazol)

Aqua bidestillata 8 ml

Acetat-Puffer 2 ml

Aminoethylcarbazol 4 Tropfen

Blockierungslösung

PBS/1% RSA 10 ml

Ziegenserum 150 µl

Sekundär-Antikörper

PBS/1% RSA 10 ml

Ziegenserum 150 µl

biotinylierter

Sekundärantikörper 50 µl

(Anti-Kaninchen IgG)

Avidin-Biotin-Enzym-Komplex

PBS/1% RSA 5 ml

Reagenz A (Avidin) 100 µl

Reagenz B (biotinylierte Peroxidase) 100 µl

Mowiol

Glycerin 6 g

Mowiol 4-88 2,4 g

Aqua bidestillata 6 ml

Tris-HCl (pH 8,5) 12 ml

DABCO 25 mg/ml Lösung

Antikörper

Tabelle 4.1: Übersicht über die in den immunhistochemischen Aufarbeitungen verwendeten Antikörper

<i>Antikörper</i>		<i>Herkunft</i>	<i>Verdünnung</i>
<i>Name</i>	<i>Typ</i>		
UMB-7 (Anti-SSTR1)	Kaninchen, monoklonal	Epitomics, Burlingame, CA, USA	1:25
UMB-1 (Anti-SSTR2)	Kaninchen, monoklonal	Epitomics, Burlingame, CA, USA	1:10
UMB-5 (Anti-SSTR3)	Kaninchen, monoklonal	Epitomics, Burlingame, CA, USA	1:20
4802 (Anti-SSTR4)	Kaninchen, polyklonal	Gramsch Laboratories, Schwabhausen, Deutschland	0,1 µg/ml
UMB-4 (Anti-SSTR5)	Kaninchen, monoklonal	Epitomics, Burlingame, CA, USA	1:10
UMB-2 (Anti-CXCR4)	Kaninchen, monoklonal	Epitomics, Burlingame, CA, USA	1:2
MIB-1 (Anti-Ki-67)	Maus, monoklonal	Dako, Glostrup, Dänemark	1:50
QBEnd 10 (Anti-CD34)	Maus, monoklonal	Dako, Glostrup, Dänemark	1:50

4.2.2 Prinzip der Immunhistochemie

Mithilfe der Immunhistochemie (IHC) ist es möglich, Oberflächenproteine (Antigene) von bestimmten Zielstrukturen sichtbar zu machen. In unserem Falle wurde dafür die indirekte Peroxidase-Methode verwendet. Die Identifizierung der Antigene wird dabei mittels eines Primärantikörpers realisiert, welcher spezifisch das Epitop des zu detektierenden Antigens erkennt und somit mithilfe seines Fc-Teils eine Bindungsstelle für den biotinylierten Sekundärantikörper bildet. Nun wird ein Peroxidase-gekoppeltes Avidin hinzugegeben, welches wiederum am Biotinrest des Sekundärantikörpers binden kann. Im nächsten Schritt wird nun das Chromogen Aminethylcarbazol (AEC) beigelegt, welches durch die Peroxidase umgesetzt wird, was sich in einer Rotfärbung der Zielstruktur widerspiegelt. Dieser Farbumschlag signalisiert somit das Vorhandensein des gesuchten Antigens im Präparat.

Zur Vereinfachung der lichtmikroskopischen Auswertung der Präparate fand eine zusätzliche Gegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin statt.

4.2.3 Durchführung der Immunhistochemie

Entparaffinierung der Schnitte

Da die Gewebeschnitte in Paraffin eingebettet waren, musste dieses zunächst entfernt werden, um eine Anfärbung und Untersuchung der Proben zu ermöglichen. Dazu wurden die Proben in Glasküvetten einsortiert und drei Mal für jeweils 20 Minuten in Xylol gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger in 99,8%-iges Ethanol überführt und abermals drei Mal für je 20 Minuten darin gewaschen, um das Xylol wieder zu entfernen.

Blockierung endogener Peroxidasen

Die Umsetzung des Chromogens erfolgt durch exogen zugeführte Peroxidasen. Um jedoch eine unspezifische Färbung durch vorhandene endogene Peroxidasen zu verhindern, muss man diese vorher blockieren, um die Reaktion zu unterbinden. Dazu wurden die Schnitte zunächst für 45 Minuten in 0,3-prozentiger Wasserstoffperoxidlösung in Methanol inkubiert. Anschließend wurden die Tumorproben zur Rehydrierung in einer absteigenden Ethanolreihe in 2-minütigen Abständen in Aqua bidest. überführt.

Antigendemaskierung

Die Antigenität der Proteine in den Tumorproben kann durch die Fixierung mit Formalin herabgesetzt sein. Um die Bindung zwischen Antigen und Antikörper und somit auch die Signalintensität zu verbessern, werden die Proben in einer handelsüblichen Mikrowelle in Citratpuffer mit einem pH-Wert von 6,0 gekocht und anschließend wieder abgekühlt.

pH-Pufferung und Einsortierung der Proben in das Sequenza®-Färbesystem

Im Anschluss wurden die Proben zunächst in Aqua bidest. und danach in einer 1%igen Rinderserumalbuminlösung (PBS/1% RSA) in Phosphatpuffer (pH 7,4) inkubiert. Dies dient der Absättigung unspezifischer Ladungen innerhalb des Gewebes und somit zur Verhinderung unspezifischer Antikörperbindungen. Zur Sicherung einer ausreichenden Kontaktzeit zwischen Probe und Antikörper wurden die Objektträger aus den Küvetten entnommen und mittels spezieller Klammern in ein Sequenza®-Färbesystem eingespannt. Hierdurch entsteht ein schmaler Spalt zwischen Objektträger und Färbesystem, welcher die hinzugegebene Antikörperlösung mittels Kapillarkraft hält und somit eine adäquate Reaktion ermöglicht. Zur

Überprüfung der korrekten Positionierung der Objektträger im System wurden die Objektträger jeweils noch einmal mit 1500 µl PBS/1% RSA-Lösung gespült.

Antikörperbindung und Färbung

Vor der eigentlichen Reaktion wurden nochmals 150 µl normales Ziegen- oder Pferdeserum zu den Proben gegeben, um unspezifische Bindungen der Antikörper und damit Hintergrundfärbungen zu vermeiden. Die Wahl des Serums ist abhängig von der Herkunft des Sekundärantikörpers, welcher im vorliegenden Fall von der Ziege oder vom Pferd stammte.

Als nächstes erfolgte die Zugabe des spezifischen Primärantikörpers mit anschließender Inkubation über mindestens zwölf Stunden bei 4°C, wobei die Einhaltung der vorgegebenen Zeit und Temperatur einen großen Einfluss auf die Reaktion hat.

Im Anschluss wurden die Objektträger zwei Mal mit je 1500 µl PBS/1% RSA gespült, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Nach Zugabe des Sekundärantikörpers (biotinylierte Anti-Primärantikörper) wurden die Proben ein weiteres Mal für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Auch hier folgte anschließend die Auswaschung ungebundener Antikörper durch Spülen mit 1500 µl PBS/1% RSA. Der nächste Schritt beinhaltete die Zugabe von 150 µl des Meerrettichperoxidase-gekoppelten Avidins, welches mit hoher Affinität an das vorhandene Biotin bindet. Nach einer erneuten Inkubation über 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde wiederum mit 1500 µl PBS/1% RSA gespült, um ungebundene Komplexe zu entfernen. Anschließend erfolgte die zweimalige Gabe von je 150 µl der AEC-Färbelösung. Nach 2 x 15-minütiger Inkubationszeit wurde die Farbreaktion durch Zugabe von Aqua bidestillata gestoppt.

Gegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin und Eindecken der Präparate

Um die Gegenfärbung durchführen zu können, wurden die Objektträger zunächst aus dem Färbesystem entfernt, in Glas-Küvetten einsortiert und zweimal für je eine Minute mit Aqua bidestillata gewaschen. Anschließend wurden die Präparate 50 Sekunden lang in einen Behälter mit Mayer's Hämatoxylin getaucht und anschließend 2,5 Minuten lang mit Aqua bidestillata gespült. Danach wurden sie zur Bläuung des Hämatoxylins 5 Mal in eine Ammoniaklösung getaucht und nochmals mittels Aqua bidestillata für 2,5 Minuten gewaschen. Diese Gegenfärbung der Zellkerne dient zur besseren Übersicht bei der späteren Auswertung der Präparate. Zum Abschluss erfolgte die Eindeckung der Proben mit Mowiol und Deckgläsern.

Tabelle 4.2: Darstellung der verschiedenen Arbeitsschritte der Immunhistochemie

<i>Arbeitsschritt</i>	<i>Lösung</i>	<i>Menge in μl</i>	<i>Zeit in min</i>
<i>Einsortieren der Schnitte in die Glasküvetten</i>			
<i>Entparaaffinierung</i>	Xylol	befüllte Küvetten	20
	Xylol		20
	Xylol		20
<i>Entfernung des Xylols</i>	99,8% Ethanol	befüllte Küvetten	20
	99,8% Ethanol		20
	99,8% Ethanol		20
<i>Blockierung endogener Peroxidasen</i>	0,3% H ₂ O ₂ in Methanol	befüllte Küvetten	45
<i>Rehydrierung der Schnitte</i>	99,8% Ethanol	befüllte Küvetten	2
	99,8% Ethanol		2
	80% Ethanol		2
	70% Ethanol		2
	Aqua bidest.		5
	Aqua bidest.		5
<i>Umsortierung in Platikküvetten mit Citratpuffer</i>	Citratpuffer 0,01M (pH 6,0)	befüllte Küvetten	
<i>Demaskierung der Antigene</i>	Kochen (600W)		8
	Abkühlen		4
	Kochen (600W)		4
	Abkühlen		4
	Kochen (600W)		4
<i>Abkühlen der Proben</i>	Kühlen auf handwarm		30
	Aqua bidest.		5
<i>pH-Pufferung –</i>	PBS mit 1% RSA	befüllte Küvetten	5

<i>Absättigung unspezif. Ladungen im Gewebe</i>			
<i>Einsortierung in Sequenza®- Färbesystem</i>			
<i>pH-Pufferung</i>	PBS mit 1% RSA	1500	
<i>Blockierung unspezif. Bindungen</i>	Blocking Serum (VECTASTAIN® Elite ABC-Kit)	150	20
<i>Antikörperbindung</i>	spezif. Antikörper	300	12h bei 4°C
<i>Waschen</i>	PBS mit 1% RSA	1500	
<i>Waschen</i>	PBS mit 1% RSA	1500	
<i>Zugabe des Sekundär- Antikörpers</i>	Sekundär-Antikörper in PBS/RSA 1% (VECTASTAIN® Elite ABC-Kit)	150	30
<i>Waschen</i>	PBS mit 1% RSA	1500	
<i>Zugabe des enzymgekoppelten Komplexes</i>	Reagenz A Reagenz B in PBS/RSA 1% (VECTASTAIN® Elite ABC-Kit)	150	30
<i>Waschen</i>	PBS mit 1% RSA	1500	
<i>Färbung der AK- gebundenen Bereiche</i>	AEC AEC	150 150	15 15
<i>Stoppen der Reaktion</i>	Aqua bidest.	1500	
<i>Einsortieren in Glasküvetten</i>			

<i>Waschen</i>	Aqua bidest. Aqua bidest.	befüllte Küvetten	1 1
<i>Gegenfärbung der Zellkerne</i>	Mayer's Hämatoxylin	befüllte Küvetten	50s
<i>Waschen</i>	Aqua bidest.		2,5
<i>Hämatoxylin-Bläuerung</i>	Ammoniakwasser (1,4 ml 25% NH ₃ auf 250 ml Aqua bidest.)	befüllte Küvetten	5 x Eintauchen
<i>Waschen</i>	Aqua bidest.		2,5
<i>Eindecken der Präparate mit Mowiol und Deckgläschen</i>			

4.2.4 Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung

Zur Unterstützung der Auswertung der Präparate wurde von diesen zusätzlich zu den immunhistochemischen Färbungen auch eine Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung angefertigt, welche in folgender Weise durchgeführt wurde:

Als Erstes wurden die Schnitte zur Entparaffinierung für jeweils 3 x 20 Minuten in Xylol getaucht. Im Anschluss erfolgte für ebenfalls 3 x 20 Minuten die Inkubation in 99,8-prozentigem Ethanol, um das Xylol wieder zu entfernen. Nachdem die Präparate für 2 x 2 Minuten mit Aqua bidestillata gewaschen worden waren, erfolgte die Färbung mit Mayer's Hämatoxylin für einen Zeitraum von 30 Minuten. Anschließend wurden die Präparate wieder für 1 Minute in Aqua bidestillata gewaschen, gefolgt von 20 Minuten in Leitungswasser und nochmals 2 Minuten in Aqua bidestillata. Dabei dient das Leitungswasser der Bläuerung der zunächst rotbraun gefärbten Zellkerne, wodurch der typische blau-violette Farbton erreicht wird. Als Nächstes erfolgte die Färbung mit Eosin über acht Minuten. Danach wurden die Präparate wiederum für jeweils 3 x 1 Minute in Aqua bidestillata und 20 Mal in 99,8-prozentiges Ethanol getaucht. Als letzter Schritt erfolgte eine erneute Inkubation für fünf Minuten in Ethanol, gefolgt von 2 x 5 und 1 x 2 Minuten in Xylol. Zuletzt wurden die Präparate mit DePeX® und einem Deckgläschen eingedeckt.

4.2.5. Auswertung der Immunhistochemie

4.2.5.1 Lichtmikroskopie

Die Auswertung der Präparate erfolgte mittels eines Lichtmikroskops der Firma Carl Zeiss, Jena, mit Vergrößerungen zwischen 100-fach und 630-fach. Im Fokus stand hierbei die Beurteilung der Färbeintensität, des Anteils an angefärbten Tumorzellen, der Membranständigkeit der Färbung, des Grads der Vaskularisierung der Tumore sowie des Verteilungs- und Expressionsmusters der gefärbten Areale.

4.2.5.2 Immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner

Um die Ergebnisse der Auswertung zu standardisieren, wurden die Präparate unter Berücksichtigung der Färbeintensität und des prozentualen Anteils der gefärbten Tumorzellen mittels des Immunreaktiven Scores nach Remmele und Stegner (IRS) bewertet.

Ursprünglich wurde der IRS im Jahre 1987 (Remmele und Stegner 1987) zur Vereinfachung und Vereinheitlichung der Auswertung immunhistochemischer Färbungen von Estrogen- und Progesteronrezeptoren in Mammakarzinomen entwickelt (Kulaksiz et al. 2002, Papotti et al. 2002, Zamora et al. 2010). Über die Jahre konnte allerdings auch ein Nutzen des Scores für die Beurteilung verschiedener weiterer Rezeptoren in anderen Tumorentitäten beobachtet werden. So zeigte sich der IRS beispielsweise als hilfreich bei der Auswertung der Expression der Cyclooxygenase-2 in Mammakarzinomen (Surowiak et al. 2005) sowie von Somatostatin-Rezeptoren in neuroendokrinen Tumoren (Surowiak et al. 2005, Gomulkiewicz et al. 2010).

Tabelle 4.3: Immunreaktiver Score (IRS) nach Remmele und Stegner (1987) (IRS = Färbeintensität x Prozentsatz positiver Zellen)

		<i>Färbeintensität</i>			
		<i>keine</i>	<i>schwache</i>	<i>mittelgradige</i>	<i>starke</i>
		<i>0</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
<i>Prozentsatz positiver Zellen</i>	<i>0%</i>	<i>IRS = 0</i>	<i>IRS = 0</i>	<i>IRS = 0</i>	<i>IRS = 0</i>
	<i>< 10%</i>	<i>IRS = 0</i>	<i>IRS = 1</i>	<i>IRS = 2</i>	<i>IRS = 3</i>
	<i>10-50%</i>	<i>IRS = 0</i>	<i>IRS = 2</i>	<i>IRS = 4</i>	<i>IRS = 6</i>
	<i>51-80%</i>	<i>IRS = 0</i>	<i>IRS = 3</i>	<i>IRS = 6</i>	<i>IRS = 9</i>
	<i>> 80%</i>	<i>IRS = 0</i>	<i>IRS = 4</i>	<i>IRS = 8</i>	<i>IRS = 12</i>

Der Immunreaktive Score nach Remmele und Stegner setzt sich zusammen aus dem Produkt der Färbeintensität (0-3 Punkte) und dem prozentualen Anteil des gefärbten Tumorgewebes (0-4 Punkte). Eine schematische Übersicht mit Beispielen für die Bewertung der Färbeintensität ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Häufig kam es vor, dass die Färbeintensität innerhalb eines Präparates variierte. Bei der Auswertung ging daher – abweichend von der ursprünglichen Bewertung nach Remmele und Stegner – nicht die stärkste Intensität im ganzen Schnitt in die Berechnung ein, sondern diejenige, die im gesamten Präparat am häufigsten vorkam. Gab es zu einem Tumor mehrere Gewebeschnitte wurden die IRS-Werte der einzelnen Präparate gemittelt. Als positiv galt eine Probe ab einem IRS-Score von ≥ 3 .

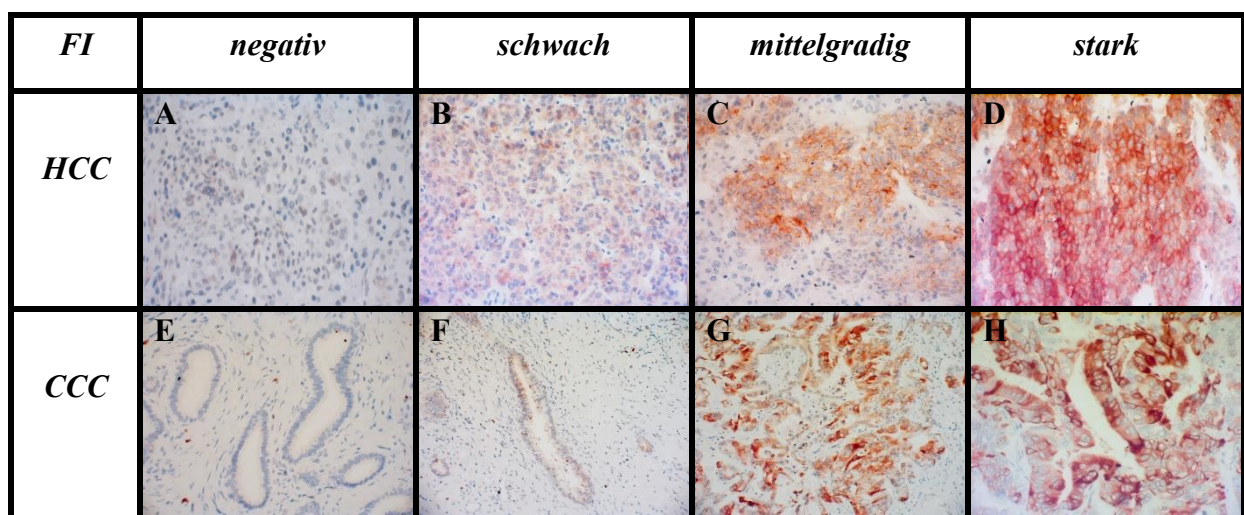


Abbildung 4.1: Beispiele für die verschiedenen Stufen der Färbeintensität (FI) anhand der SSTR2-Expression beim hepatozellulären Karzinom (HCC; Abbildungen A-D) und der SSTR1-Expression beim cholangiozellulären Karzinom (CCC; Abbildungen E-H). Immunhistochemie (rotbraune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin; Originalvergrößerung: x200 (F, G) bzw. x400 (A-E, H)

Tabelle 4.4: Darstellung der IRS-Klassifikation auf Grundlage des IRS-Scores (IRS = Immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner)

<i>IRS-Score</i>	<i>IRS-Klassifikation</i>	
<i>1</i>	<i>0</i>	<i>negativ</i>
<i>2-3</i>	<i>1</i>	<i>schwach</i>
<i>4-8</i>	<i>2</i>	<i>mäßig</i>
<i>9-12</i>	<i>3</i>	<i>stark</i>

Um die Expression der untersuchten Rezeptoren anschaulicher vergleichen zu können, wurden die Werte für den IRS nochmals klassifiziert. Hierdurch ergeben sich vier Gruppen (IRS-Klassifikation 0-3), durch welche die Expressionsstärke in negativ, schwach, mäßig und stark unterteilt wird. Tabelle 4.4 gibt hierzu eine Übersicht.

4.2.5.3 Proliferationsmarker Ki-67

Als Marker für die Proliferation von Geweben und somit auch der Teilungsaktivität eines Tumors stellt das Protein Ki-67 einen wichtigen Bestandteil in der Untersuchung von Tumorproben dar. Die Funktion als Proliferationsmarker kommt daher, dass eine Expression des Proteins vor allem in den aktiven Phasen des Zellzyklus (G₁-, S-, G₂- und M-Phase) im Zellkern beobachtet werden kann. In der G₀-Phase tritt es hingegen nicht auf. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine hohe Ki-67-Expression in Gewebeproben einer starken Proliferation des Gewebes entspricht und umgekehrt (Scholzen und Gerdes 2000).

Die Färbung des Ki-67-Proteins erfolgte mittels des monoklonalen Maus-Antikörpers MIB-1 der Firma Dako. Die Vorgehensweise ist dabei identisch zu den Schritten in Kapitel 4.2.3.

Die Auswertung der Ki-67-Expression innerhalb der Tumorproben erfolgte manuell mittels Lichtmikroskopie bei 400-facher Vergrößerung. Dabei wurden pro Präparat zehn Hauptgesichtsfelder aus einem repräsentativen Tumorabschnitt ausgewählt und sowohl negative als auch positive (angefärbte) Zellkerne ausgezählt. Aus der Gesamtheit der erfassten Zellkerne ergab sich somit der prozentuale Anteil an Zellkernen mit Ki-67-Expression.

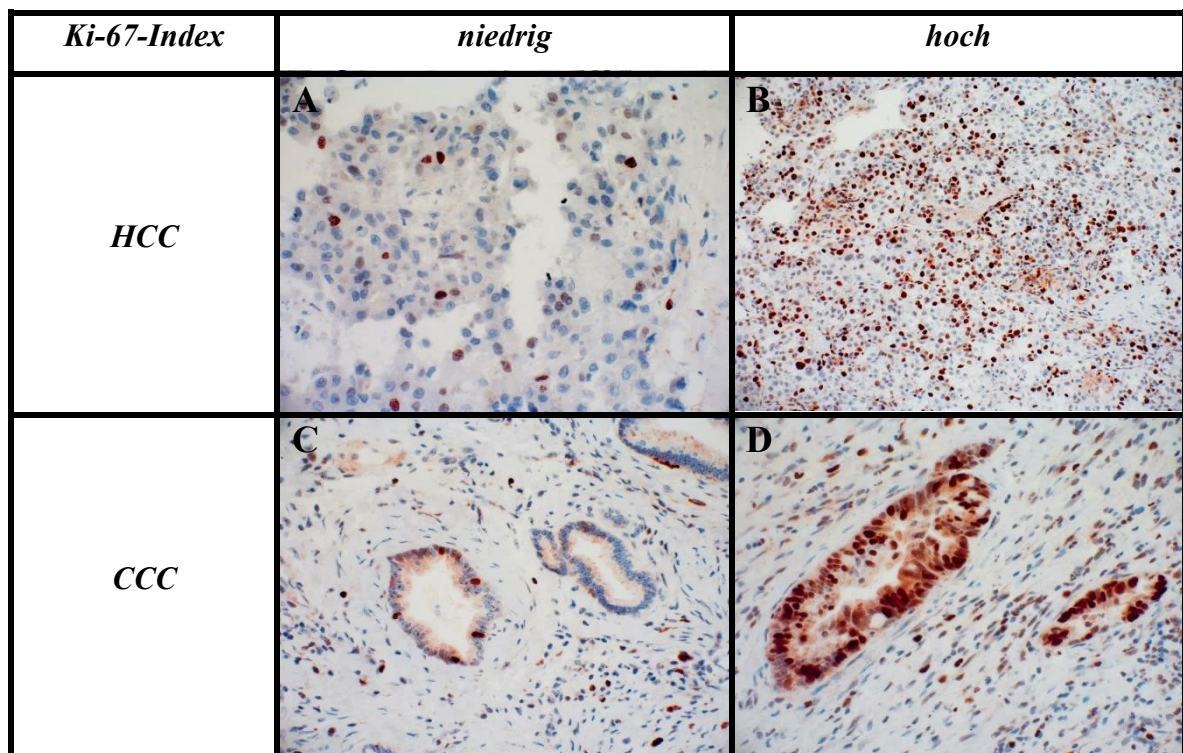


Abbildung 4.2: Beispiele für eine niedrige und eine hohe Ki-67-Expression in hepatozellulären (HCC) und cholangiozellulären Karzinomen (CCC). Immunhistochemie (rotbraune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin; Originalvergrößerung x200 (B) bzw. x400 (A, C, D)

4.2.5.4 Gefäßmarker CD34

Da sich die Abgrenzung von vor allem gut differenzierten HCCs gegenüber dem umliegenden, teils auch zirrhotischen, Lebergewebe schwierig gestalten kann, wurde zusätzlich zur HE- und Ki-67-Färbung eine weitere Färbung zur Visualisierung der Tumorgefäße mittels eines Antikörpers gegen das CD34 angefertigt. Dieses Protein erwies sich als potenter Marker für die Gefäßneubildung in verschiedensten Neoplasien, so auch in den sehr gut vaskularisierten HCCs und CCCs. In einer Studie von Kimura et al. konnte des Weiteren belegt werden, dass es ausschließlich in Kapillaren des HCC, nicht jedoch in Sinusoiden gesunder Lebern oder auch bei alleiniger Leberzirrhose verstärkt nachzuweisen war (Kimura et al. 1998). Ähnliche Ergebnisse zeigte eine Studie von Cui et al. (1996). Hier wurde zwar auch eine leichte CD34-Expression bei chronisch entzündeten und zirrhotischen Lebern beobachtet, allerdings war diese wesentlich geringer als die CD34-Expression bei HCCs (Cui et al. 1996). Daher eignet es sich als diagnostische Stütze zur Identifikation eines HCC gegenüber dem umgebenden Lebergewebe (Kimura et al. 1998).

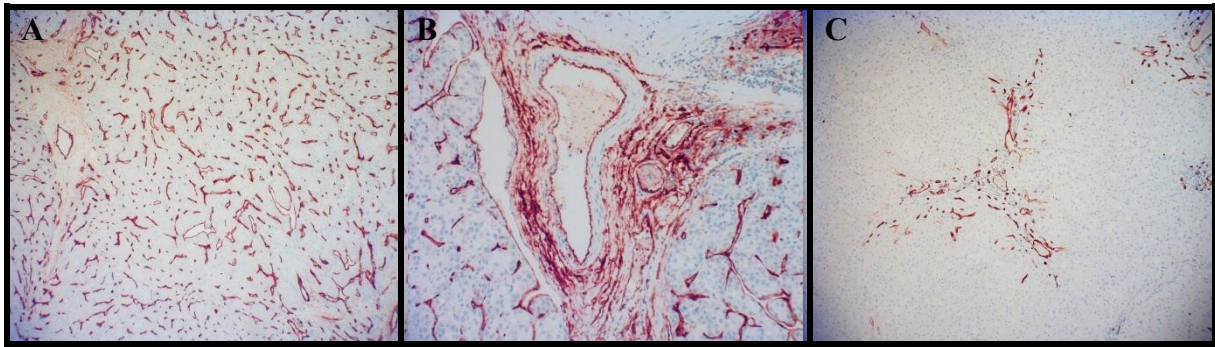


Abbildung 4.3: CD34-Expression in hepatozellulären Karzinomen (A und B) im Vergleich zu normalem Lebergewebe (C). Immunhistochemie (rotbraune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin; Originalvergrößerung x200 (A, B) bzw. x100 (C)

4.3 Statistik

Für die statistischen Auswertungen wurde das Programm SPSS® der Firma IBM in der Version 22.0.0 verwendet.

Für Patienten, bei denen mehrere Gewebeproben vorlagen, wurde aus den einzelnen IRS für die Somatostatin-Rezeptoren und für den CXCR4 jeweils pro Tumor ein Mittelwert gebildet, mit welchem die weiteren statistischen Berechnungen erfolgten. Ausgewertet wurden sowohl die metrischen IRS-Scores als auch die ordinale IRS-Klassifikation sowie die metrischen Ki-67-Werte.

5 Ergebnisse

5.1 Patientendaten

Die Patienten waren zum Diagnosezeitpunkt zwischen 32 und 87 Jahren alt. Das Durchschnittsalter betrug 66,3 Jahre. Dabei waren die Patienten mit einem CCC mit durchschnittlich 68,5 Jahren im Alter vergleichbar mit den HCC-Patienten, die im Schnitt 68 Jahre alt waren. Die beiden Patienten mit einer FNH waren mit 32 und 48 Jahren die jüngsten im Kollektiv. In Abbildung 5.2 ist die Altersverteilung der Patienten noch einmal grafisch dargestellt.

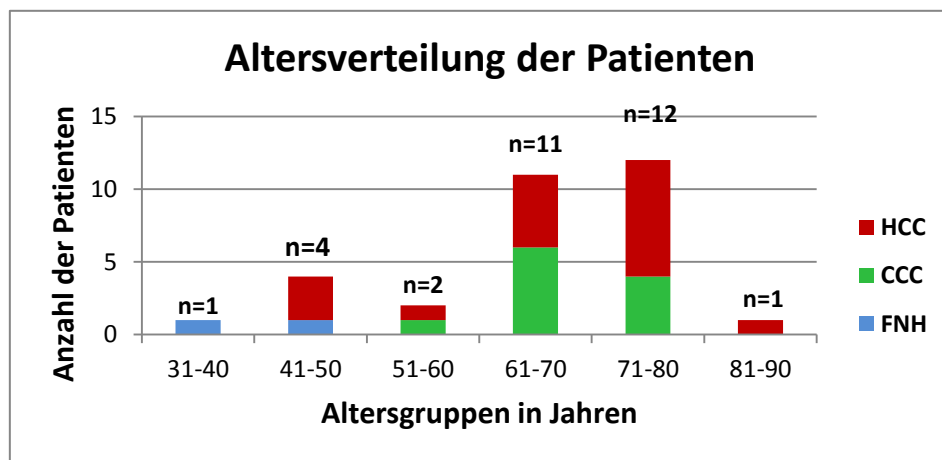


Abbildung 5.1: Altersverteilung der Patienten, aufgliedert nach Dekaden; HCC = hepatozelluläres Karzinom, CCC = cholangiozelluläres Karzinom, FNH = fokale noduläre Hyperplasie

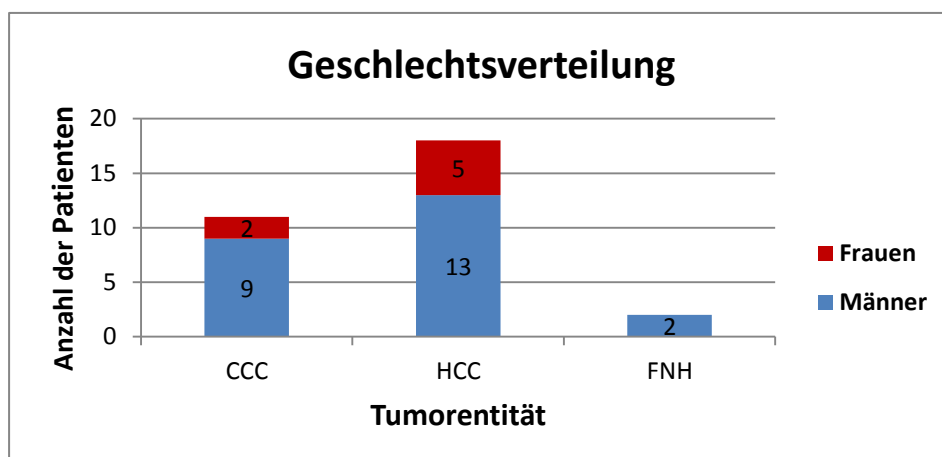


Abbildung 5.2: Geschlechtsverteilung der Patienten, aufgliedert nach den drei Tumorentitäten; HCC = hepatozelluläres Karzinom, CCC = cholangiozelluläres Karzinom, FNH = fokale noduläre Hyperplasie

Das Verhältnis zwischen Männern und Frauen betrug 24:7. Somit war der Anteil an Männern im Patientenkollektiv deutlich erhöht. Dies galt sowohl für die HCC- als auch für die CCC-Patienten. Die beiden Patienten mit FNH waren jeweils männlich.

5.2 Klinische Daten

5.2.1 TNM-Klassifikation

Zum Diagnosezeitpunkt befanden sich die meisten Patienten mit einem HCC in den Stadien T1 (44,4%) und T2 (38,9%). Jeweils ein Patient wurde im T3- oder im T4-Stadium diagnostiziert. Bei einem Patienten konnte keine eindeutige Zuweisung getroffen werden. Ähnlich verhielt es sich mit der Einordnung des Lymphknotenstatus. Bei elf Patienten (61,1%) wurde dieser entweder nicht untersucht oder konnte mittels der vorliegenden Daten nicht festgestellt werden. Bei 38,9% konnte ein histologisch gesicherter N0-Status erhoben werden. Ein N1-Status wurde bei keinem der HCC-Patienten diagnostiziert. Vier Patienten (22,2%) wiesen zum Diagnosezeitpunkt bereits Metastasen und somit einen M1-Status auf, 72,2% der Patienten waren hingegen metastasenfrei (M0). Bei einem Patienten war es laut Patientenakte nicht möglich, einen eindeutigen M-Status zu erheben (Mx).

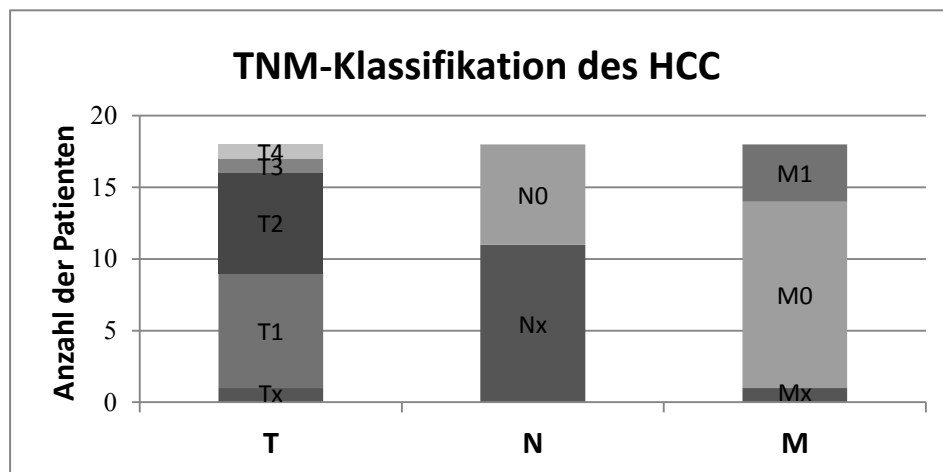


Abbildung 5.3: TNM-Klassifikation der untersuchten hepatozellulären Karzinome

Von den Patienten mit einem CCC befanden sich zum Diagnosezeitpunkt 36,4% im T1-Stadium, die verbleibenden 63,6% im T2-Stadium. Bei zwei Patienten (18,2%) wurde ein Lymphknotenbefall diagnostiziert (N1), bei den restlichen neun Patienten (81,8%) konnte dieser ausgeschlossen werden (N0). Ebenso verhielt es sich mit dem M-Status. Zwei Patienten wiesen bereits Metastasen auf (M1), bei neun Patienten wurden diese nicht nachgewiesen (M0).

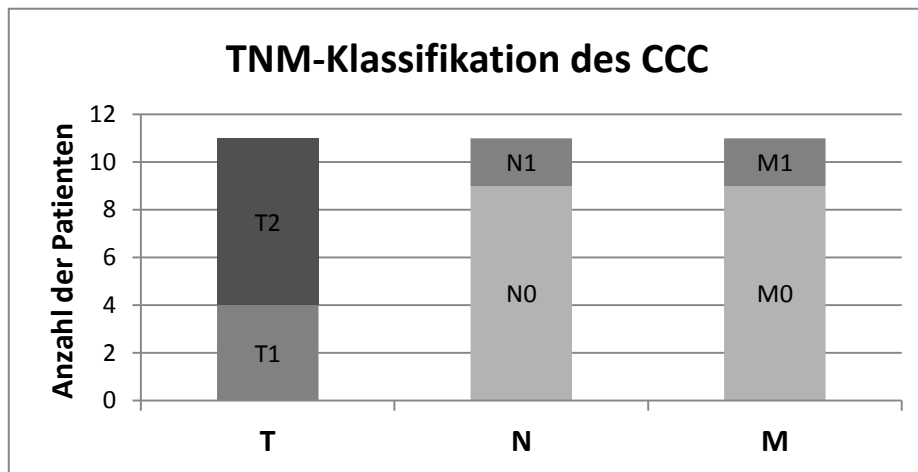


Abbildung 5.4: TNM-Klassifikation der untersuchten cholangiozellulären Karzinome

5.2.2 Grading

Das Grading des HCC richtet sich nach der Edmondson-Steiner-Klassifikation. Hierbei wiesen vier Tumoren (22,2%) einen G1-Status auf. Doppelt so viele zeigten einen G2- (44,4%) und 11,1% einen G3-Status. Für die CCCs richtet sich die Einteilung nach der WHO-Klassifikation. Die meisten Tumoren wurden als mäßig differenziert beschrieben und erhielten somit einen G2-Status (36,4%). Jeweils einmal wurde ein gut differenzierter Tumor (G1) sowie ein undifferenzierter Tumor (G4) diagnostiziert. Die verbliebenen 18,2% waren schlecht differenziert (G3).

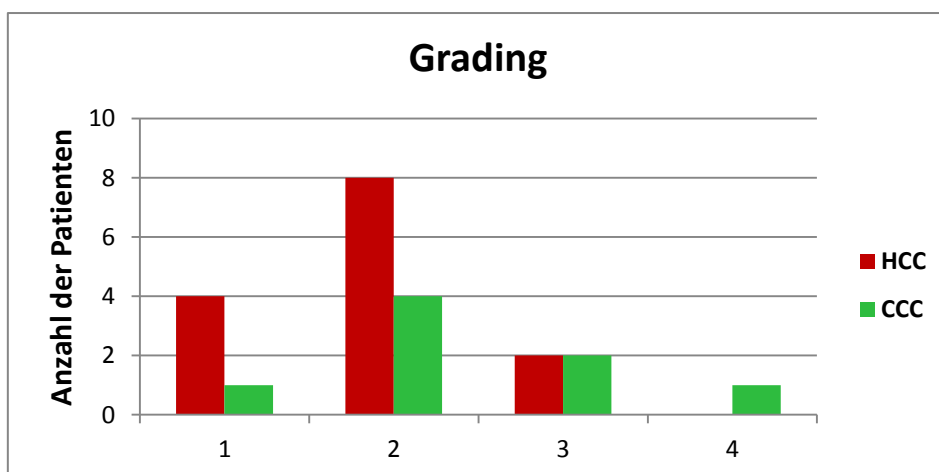


Abbildung 5.5: Histopathologisches Grading der untersuchten Präparate nach der Edmondson-Steiner-Klassifikation (HCC) bzw. WHO-Klassifikation (CCC); HCC = hepatozelluläres Karzinom, CCC = cholangiozelluläres Karzinom

5.2.3 Überlebenskurven

Im folgenden Abschnitt wurde das Überleben der Patienten im Zusammenhang mit verschiedenen Faktoren untersucht, um Einflüsse zu ermitteln, die sich eventuell positiv oder negativ auf die Überlebenszeit auswirken könnten. Die Überlebenszeit errechnet sich aus der Differenz aus Diagnosedatum und Sterbedatum bzw. Datum der letzten Verlaufskontrolle. Die Daten dafür erhielten wir aus dem Tumorzentrum in Erfurt. Vier Patienten (drei HCCs, ein CCC) mussten wir hierfür aus der Berechnung ausschließen, da entweder eine nicht-tumorbedingte Todesursache vorlag oder im Tumorzentrum keine Daten über die Patienten vorhanden waren und somit die Berechnung der Überlebensdauer nicht möglich war.

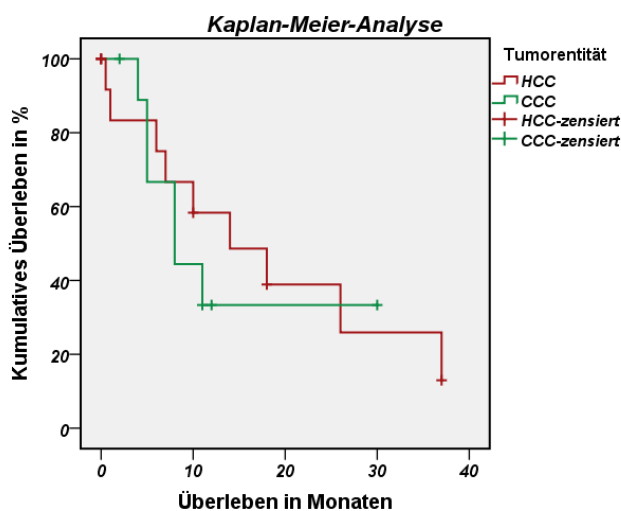
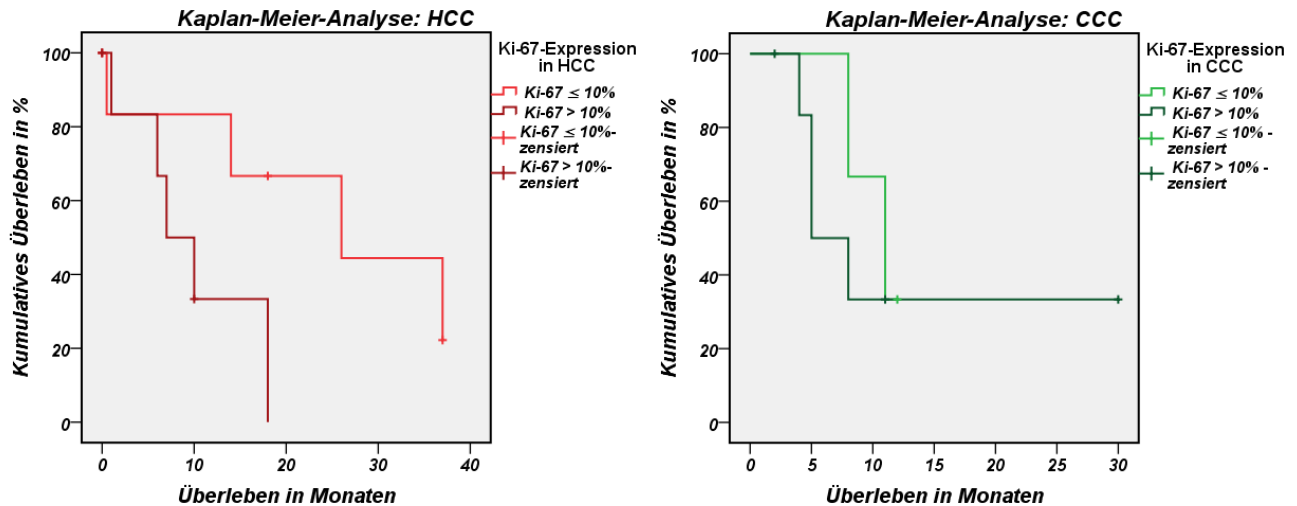


Abbildung 5.6:

Darstellung des kumulativen Überlebens von Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom (HCC) im Vergleich mit Patienten mit einem cholangiozellulären Karzinom (CCC) anhand einer Kaplan-Meier-Kurve (Breslow-Test: $p = 0,633$)

Abbildung 5.6 zeigt das kumulative Überleben der Patienten in Abhängigkeit von der Zeit zwischen Diagnosestellung und Sterbedatum, aufgeteilt nach HCC und CCC. Hierbei zeigt sich, dass das mediane Überleben der HCC-Patienten mit 14 Monaten deutlich besser ist als das der CCC-Patienten mit 8 Monaten, wobei der Unterschied laut Breslow-Test nicht signifikant war, was höchstwahrscheinlich auf die relativ geringe Fallzahl (v.a. bei den CCC) zurückzuführen ist.

Des Weiteren wurde die Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Ki-67-Expression untersucht. Hierzu wurden die Patienten in zwei Gruppen unterteilt: Die erste Gruppe bildeten Patienten mit einem niedrigen Ki-67-Index ($\leq 10\%$), die zweite Gruppe diejenigen mit einem hohen Ki-67-Index ($> 10\%$).



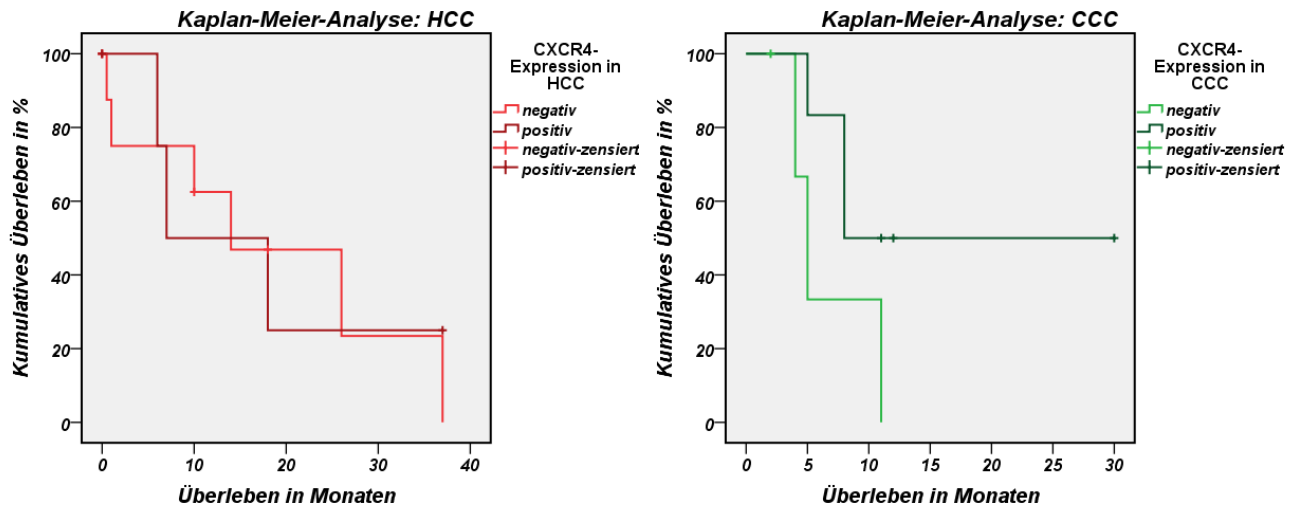
Abbildungen 5.7 und 5.8: Darstellung des medianen Überlebens von Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom (HCC; links) und von Patienten mit einem cholangiozellulären Karzinom (CCC; rechts) mit niedrigem Ki-67-Index im Vergleich mit solchen mit hohem Ki-67-Index anhand einer Kaplan-Meier-Kurve (Log-Rank-Test: $p = 0,066$ (HCC); $p = 0,605$ (CCC))

Für die HCC-Patienten zeigte sich dabei ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Das mediane Überleben der Gruppe mit niedrigem Ki-67-Index war mit 26 Monaten fast viermal so hoch wie das der Gruppe mit hohem Ki-67-Index mit 7 Monaten. Die gleiche Tendenz zeigte sich auch bei den CCC-Patienten, wenn auch nicht ganz so ausgeprägt. Trotzdem lebten die Patienten der Gruppe mit niedrigem Ki-67-Index mit 11 Monaten mehr als doppelt so lang wie die Patienten mit hohem Ki-67-Index. Hier betrug das mediane Überleben nur 5 Monate. Aufgrund der geringen Fallzahl waren in allen Fällen die Unterschiede im Log-Rank-Test jedoch nicht signifikant.

Weiterhin wurde das Überleben in Abhängigkeit vom Ausmaß der Expression der am häufigsten vorkommenden Rezeptor-Subtypen (siehe Kapitel 5.3.5) analysiert. Dies war für beide Tumorentitäten der CXCR4-Rezeptor und bei den CCCs zusätzlich der SSTR1. Auch für diese Faktoren wurden die Tumormproben in zwei Gruppen eingeteilt, nämlich abhängig vom IRS-Score in eine Gruppe mit einem niedrigen IRS-Score von < 3 (Rezeptor-negativ) und eine Gruppe mit mittelmäßig bis hohem IRS-Score von ≥ 3 (Rezeptor-positiv).

Für den CXCR4-Rezeptor zeigten sich dabei unterschiedliche Ergebnisse für HCC- und CCC-Patienten. Bei den HCC-Patienten hatte die Gruppe mit einem IRS-Score < 3 mit 14 Monaten eine doppelt so hohe mediane Überlebenszeit wie die Gruppe mit einem hohen IRS-Score ≥ 3 (7 Monate). Im Gegensatz dazu war das mediane Überleben der CCC-Patienten mit niedrigem

IRS-Score mit 5 Monaten etwas geringer als das der Gruppe mit einem IRS-Score ≥ 3 . Hier betrug die mediane Überlebenszeit 8 Monate. Allerdings konnte für diese Unterschiede in den Überlebenszeiten keine Signifikanz nachwiesen werden (Breslow-Test für HCC: 0,930; Log-Rank-Test für CCC: 0,105).



Abbildungen 5.9 und 5.10: Darstellung des kumulativen Überlebens von Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom (HCC; links) und von Patienten mit einem cholangiozellulären Karzinom (CCC; rechts) mit entweder positiver oder negativer Expression des CXCR4 anhand von Kaplan-Meier-Kurven (Breslow-Test für HCC: $p = 0,930$; Log-Rank-Test für CCC: $p = 0,105$)

Bezüglich des SSTR1 konnte nur ein geringer Unterschied festgestellt werden. Bei den CCC-Patienten mit einer geringen SSTR1-Expression betrug die mediane Überlebenszeit 11 Monate und war somit etwas höher als bei der Gruppe mit einem IRS-Score ≥ 3 mit 8 Monaten. Das Ausmaß der Expression der anderen SSTRs hatte keinen Einfluss auf das Überleben.

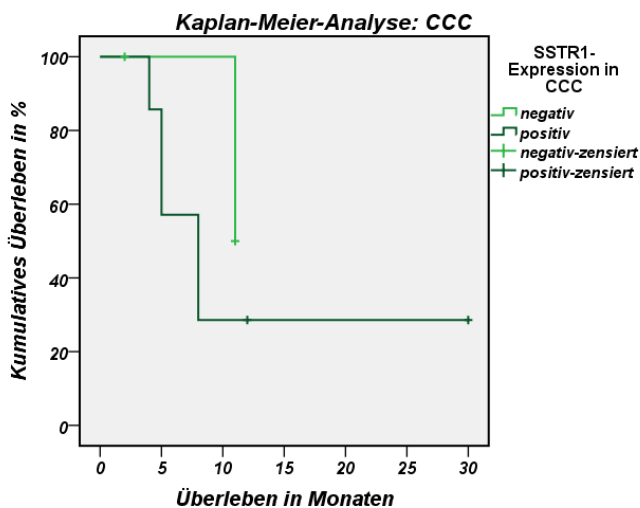
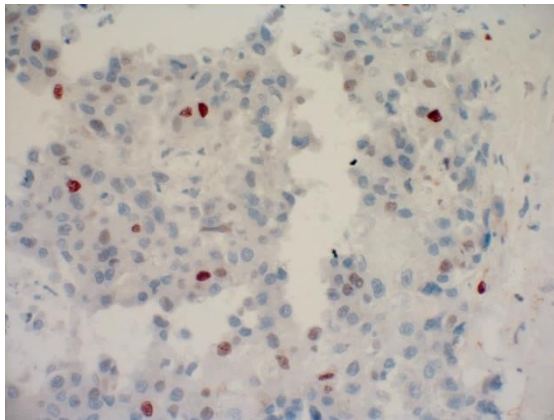


Abbildung 5.11: Darstellung des kumulativen Überlebens von Patienten mit einem cholangiozellulären Karzinom (CCC) mit positiver oder negativer Expression des SSTR1 anhand einer Kaplan-Meier-Kurve (Log-Rank-Test: $p = 0,397$)

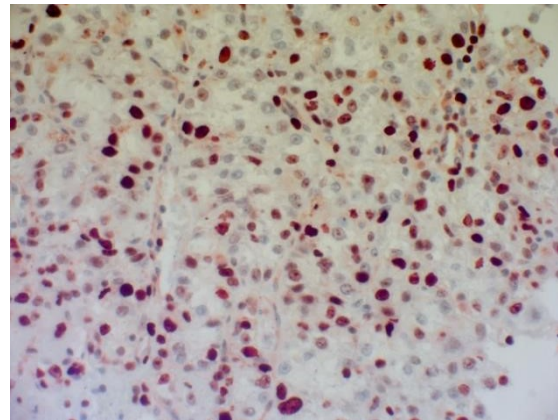
5.3 Immunhistochemie

5.3.1 Ki-67-Expression

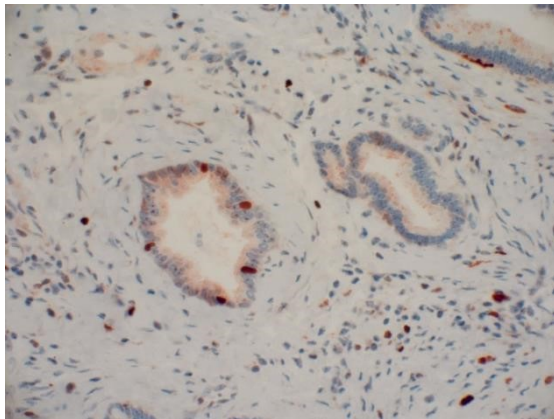
Sämtliche Proben wurden auf die Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 hin untersucht. Dabei wurde ein Lichtmikroskop mit 400-facher Vergrößerung verwendet. Pro Präparat wurden jeweils 10 Gesichtsfelder manuell ausgezählt, wobei nur Zellen mit starker Kernfärbung als positiv gewertet wurden. Gab es von einem Patienten mehrere Präparate, wurden die Ergebnisse gemittelt.



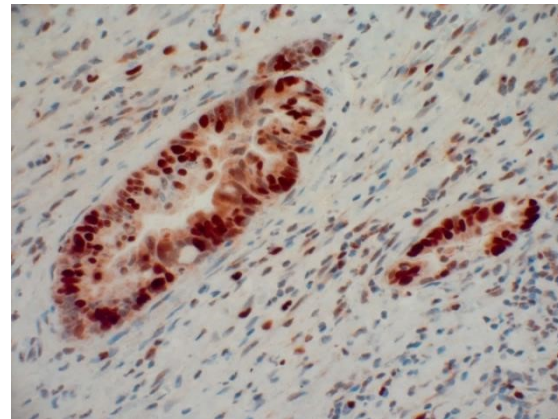
A) Geringer Ki-67-Index eines HCC



B) Hoher Ki-67-Index eines HCC



C) Niedriger Ki-67-Index eines CCC



D) Hoher Ki-67-Index eines CCC

Abbildung 5.12: Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 (rotbraune Färbung) in Schnitten von hepatozellulären Karzinomen (HCC) und cholangiozellulären Karzinomen (CCC). Immunhistochemie (rotbraune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin; Originalvergrößerung x400 (A, B) bzw. x600 (C, D)

Dabei zeigten sich insgesamt etwas höhere Proliferationswerte bei den CCC- als bei den HCC-Patienten, jedoch konnte bei beiden Gruppen kein Ki-67-Index über 40% nachgewiesen werden. Vor allem bei den HCCs überwogen eher niedrigproliferative Präparate (83,3% der Fälle mit einem Ki-67-Index unter 20%). Bei HCC-Patienten mit mehreren Tumorschnitten

war die Verteilung innerhalb der Schnitte recht homogen. Die Differenz der Ki-67-Indizes betrug meist nicht mehr als 5-10%. Innerhalb der Präparate von CCC-Patienten waren die Spannweiten etwas größer (die größte Spannweite betrug hier zwischen 5% und 40% innerhalb ein und desselben Tumors). Die Tumorproben der beiden Patienten mit FNH zeigten mit jeweils 3% einen sehr geringen Ki-67-Index.

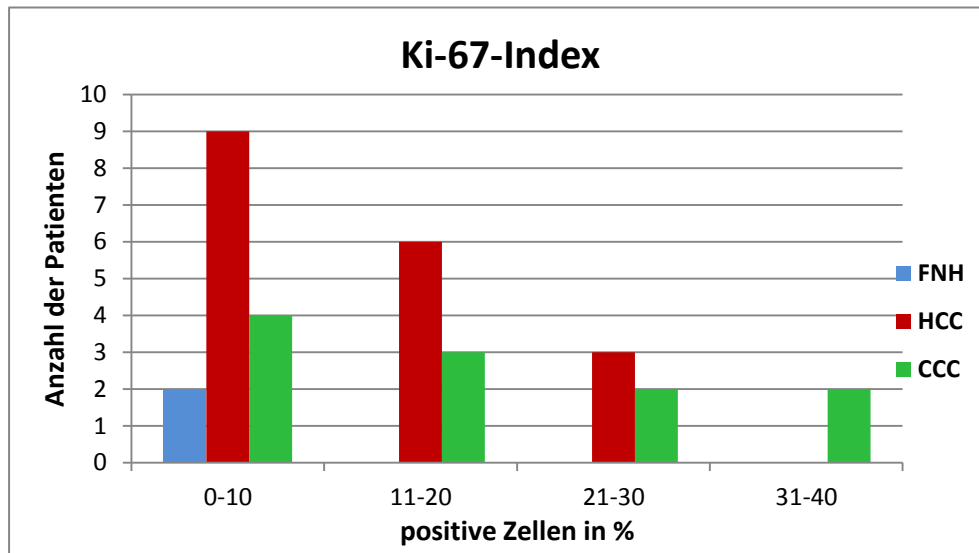


Abbildung 5.13: Prozentuale Expression des Proliferationsmarkers Ki-67, aufgeteilt nach Tumorentitäten; HCC = hepatozelluläres Karzinom, CCC = cholangiozelluläres Karzinom, FNH = fokale noduläre Hyperplasie

5.3.2 Somatostatin-Rezeptor-Expression

Alle HCC- und CCC-Schnitte wurden auf die Expression der Somatostatin-Rezeptoren 1 bis 5 hin untersucht. Für die Auswertung wurde für jeden Tumor, von dem es mehrere histologische Schnitte gab, ein Mittelwert gebildet. Zudem galten Präparate mit einem IRS-Score von ≤ 1 als negativ und werden daher in den folgenden Tabellen nicht mit aufgeführt. Die positiven Präparate wurden noch einmal in drei Untergruppen eingeteilt: Werte > 1 und ≤ 3 galten als „schwach positiv“, Werte ≥ 4 und ≤ 8 als „mäßig positiv“ und Werte ≥ 9 und ≤ 12 als „stark positiv“.

SSTR1

Insgesamt konnte man starke Unterschiede bezüglich der SSTR1-Expression sowohl zwischen den Tumorentitäten, als auch zwischen den einzelnen Schnitten des gleichen Tumors beobachten. Der Großteil der HCC-Präparate war negativ, lediglich bei zwei

Patienten konnte eine schwach positive Expression gezeigt werden. Mittelmäßig und stark positive Präparate waren unter den HCCs nicht zu finden.

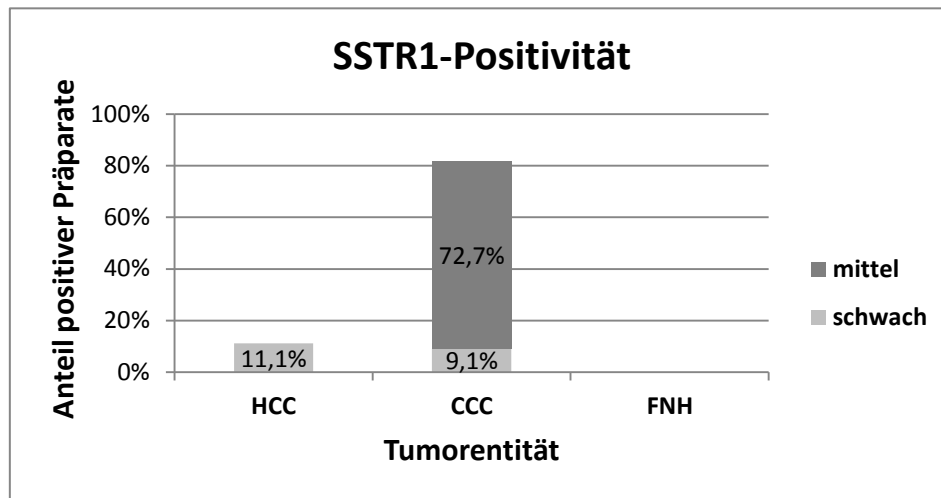
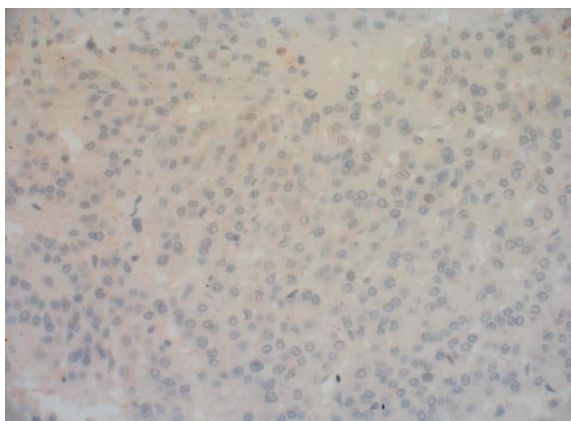
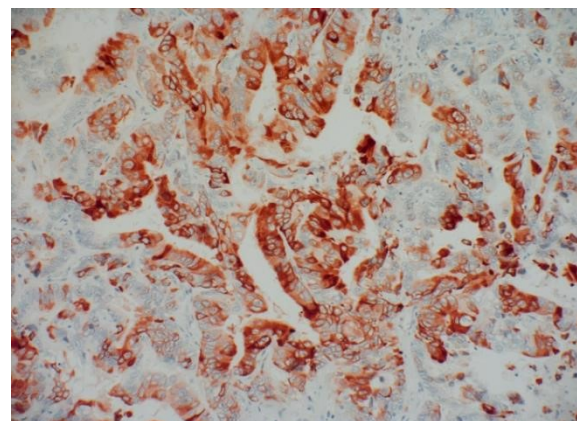


Abbildung 5.14: Positivität für den SSTR1, unterteilt nach Tumorentitäten; HCC = hepatozelluläres Karzinom, CCC = cholangiozelluläres Karzinom, FNH = fokale noduläre Hyperplasie

Bei den CCCs wies mit 81,8% der überwiegende Teil der Tumoren eine SSTR1-Expression auf. Der Großteil der Färbungen war als mäßig positiv zu bewerten, wobei die Unterschiede zwischen den einzelnen Schnitten eines Tumors relativ groß waren. Nur bei einem Patienten war eine schwache Positivität zu verzeichnen. Stark positive Expressionen waren jedoch auch hier nicht vorhanden, lediglich ein einzelner Schnitt eines CCC erreichte einen IRS-Score von 10, was sich jedoch durch Mittelung der Werte mit den anderen Schnitten des selben Tumors relativierte.



A) Schwache SSTR1-Expression in einem HCC



B) Starke SSTR1-Expression in einem CCC

Abbildung 5.15: SSTR1-Expression in Schnitten von einem hepatozellulären Karzinom (HCC) und von einem cholangiozellulären Karzinom (CCC). Immunhistochemie, Gegenfärbung mit Hämatoxylin; Originalvergrößerung x400 (A) bzw. x200 (B)

SSTR2

Auch für die SSTR2-Expression zeigten sich relativ große Unterschiede zwischen den einzelnen Schnitten innerhalb eines Tumors. Die IRS-Scores der unterschiedlichen Präparate eines CCCs schwankten z.B. zwischen Werten von eins bis sechs. Insgesamt war die SSTR2-Expression in allen Tumorentitäten jedoch recht gering. Bei den HCC-Präparaten fand sich lediglich in 16,7% der Fälle (n = 3) eine schwache Positivität. Mäßig oder stark positive Tumorschnitte konnten, bei einem Höchstwert des IRS-Scores von drei, nicht beobachtet werden.

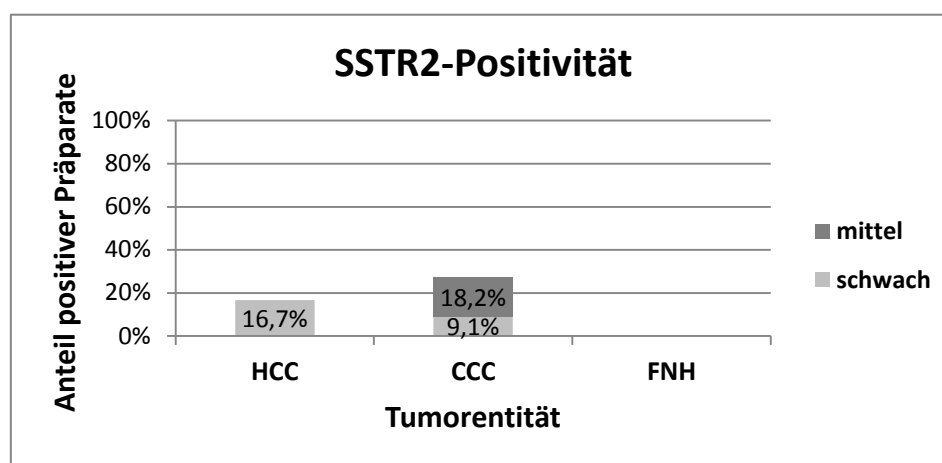
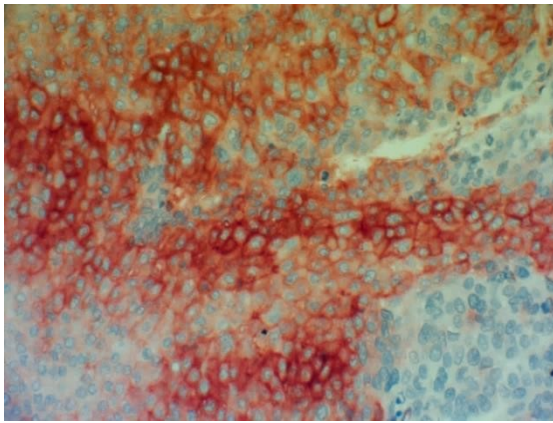
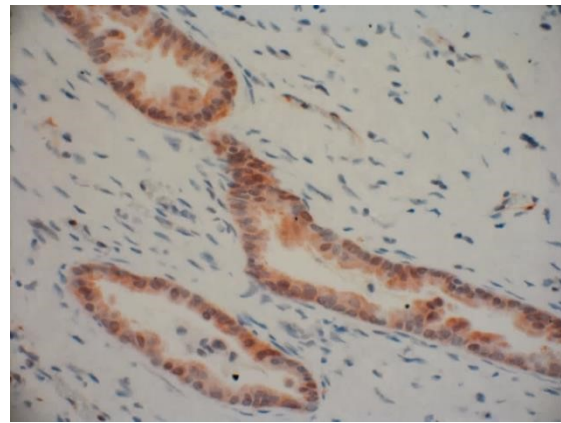


Abbildung 5.16: Positivität für den SSTR2, unterteilt nach den drei Tumorentitäten; HCC = hepatozelluläres Karzinom, CCC = cholangiozelluläres Karzinom, FNH = fokale noduläre Hyperplasie

Bei den CCCs zeigten ebenfalls drei Tumoren eine SSTR2-Expression, wovon zwei eine mittelmäßige und ein Präparat eine schwache Positivität aufwies. Der höchste erreichte IRS-Score lag hier bei einem Wert von 6. In den FNH-Proben konnte der SSTR2 nicht nachgewiesen werden.



A) Starke SSTR2-Expression in einem HCC



B) Mittelgradige SSTR2-Expression in einem CCC

Abbildung 5.17: SSTR2-Expression in Schnitten von einem hepatozellulären Karzinom (HCC) und von einem cholangiozellulären Karzinom (CCC). Immunhistochemie, Gegenfärbung mit Hämatoxylin; Originalvergrößerung x400

SSTR3

Der Großteil der untersuchten Präparate zeigte keinerlei Expression des SSTR3 und wurde somit als negativ bewertet. Lediglich bei einem HCC-Präparat konnte ein IRS-Score von sechs ermittelt werden, es ist somit als mäßig positiv zu werten. Auch ein Schnitt eines CCCs wurde mit einem IRS-Score von sechs bewertet, allerdings waren alle weiteren Schnitte desselben Tumors negativ und durch Mittelung aller Werte betrug der Gesamtwert 1, wodurch das Präparat insgesamt als negativ gewertet worden ist. Zusätzlich anzumerken ist die starke Hintergrundfärbung des Lebergewebes durch den verwendeten Antikörper, was die Auswertung deutlich erschwerte.

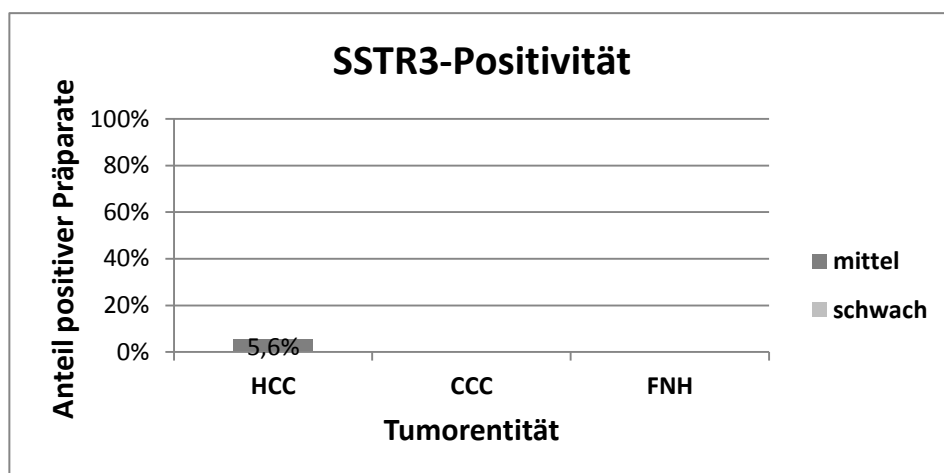
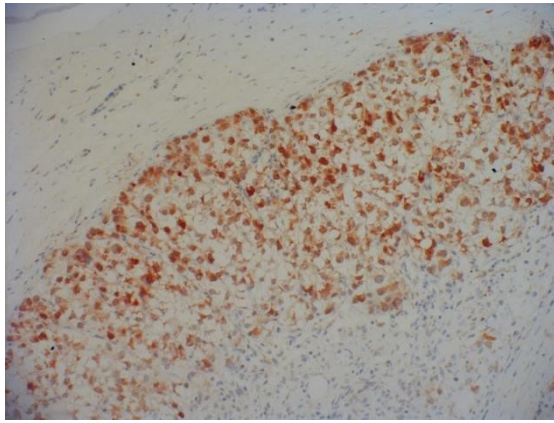
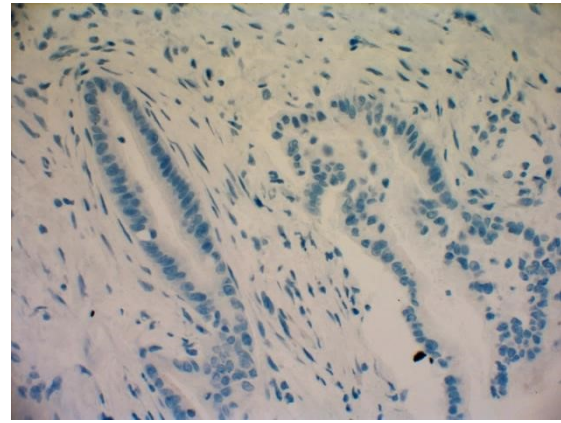


Abbildung 5.18: Positivität für den SSTR3, unterteilt nach den drei Tumorentitäten; HCC = hepatozelluläres Karzinom, CCC = cholangiozelluläres Karzinom, FNH = fokale noduläre Hyperplasie



A) Mittelgradige SSTR3-Positivität eines HCC



B) Negative SSTR3-Expression in einem CCC

Abbildung 5.19: SSTR3-Expression in Schnitten von einem hepatozellulären Karzinom (HCC) und von einem cholangiozellulären Karzinom (CCC). Immunhistochemie, Gegenfärbung mit Hämatoxylin; Originalvergrößerung x200 (A) bzw. x400 (B)

SSTR4

Ähnlich wie beim SSTR3 wies der überwiegende Teil der Präparate keine Positivität bezüglich des SSTR4 auf. Zwei HCC-Präparate erreichten einen IRS-Score von zwei und sind somit als schwach positiv zu werten. Mittelmäßig oder stark positive Expressionen konnten nicht aufgezeigt werden. Die CCC- und FNH-Präparate waren durchweg negativ.

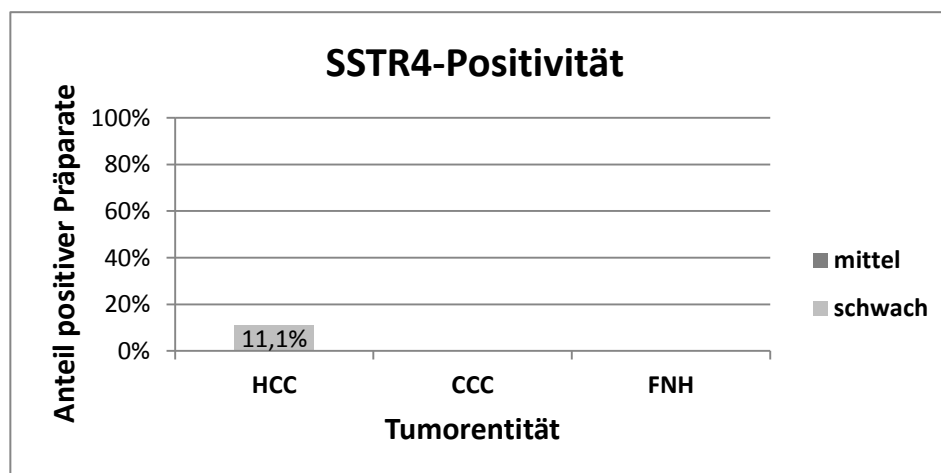
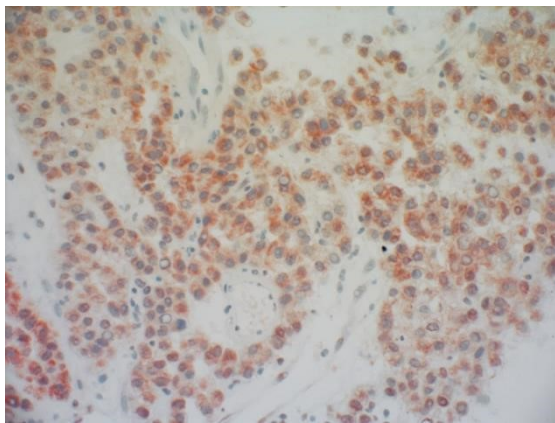
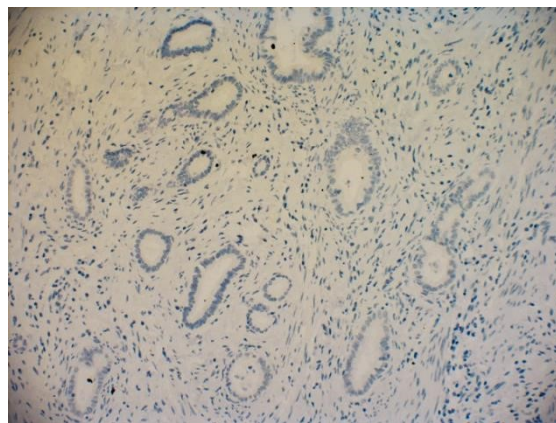


Abbildung 5.20: Positivität für den SSTR4, unterteilt nach den drei Tumorentitäten; HCC = hepatozelluläres Karzinom, CCC = cholangiozelluläres Karzinom, FNH = fokale noduläre Hyperplasie



A) Niedrige SSTR4-Expression in einem HCC



B) Negative SSTR4-Expression in einem CCC

Abbildung 5.21: SSTR4-Expression in Schnitten von einem hepatozellulären Karzinom (HCC) und von einem cholangiozellulären Karzinom (CCC). Immunhistochemie, Gegenfärbung mit Hämatoxylin; Originalvergrößerung: x400 (A) bzw. x200 (B)

SSTR5

Der SSTR5 war nach dem SSTR1 der insgesamt am zweithäufigsten positive Somatostatin-Rezeptor. Innerhalb der positiven HCC-Präparate war die Expressionsverteilung relativ homogen. Zwischen den IRS-Scores der einzelnen Schnitte waren die Unterschiede mit Werten von drei bis sechs gering. Anders sah es bei den CCCs aus; hier schwankten die IRS-Scores innerhalb eines Tumors zwischen Werten von null bis sechs. In den untersuchten FNH-Proben war der SSTR5 nicht nachweisbar.

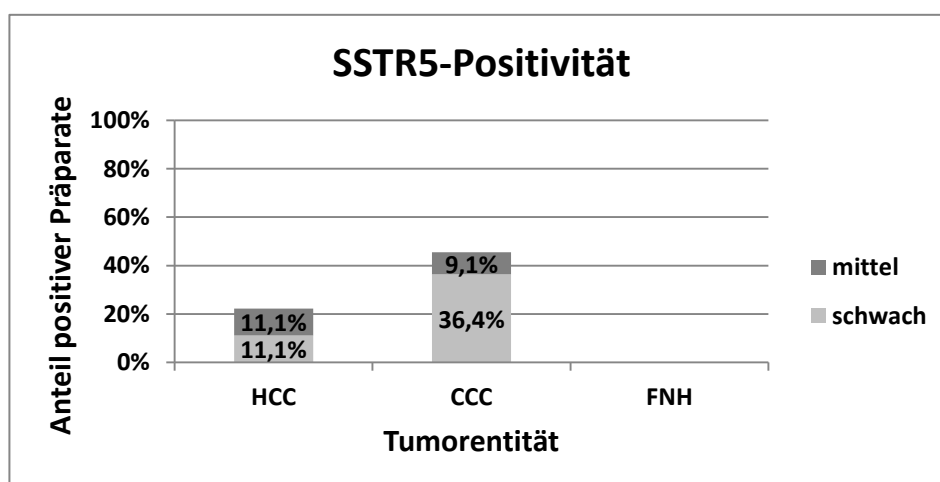
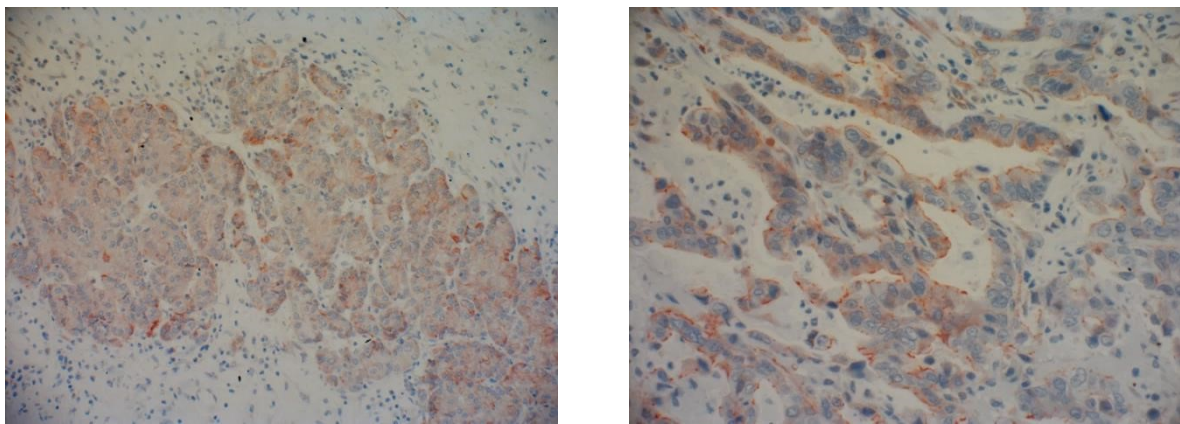


Abbildung 5.22: Positivität für den SSTR5, unterteilt nach den drei Tumorentitäten; HCC = hepatozelluläres Karzinom, CCC = cholangiozelluläres Karzinom, FNH = fokale noduläre Hyperplasie

Insgesamt zeigten etwas über 20% der HCCs eine SSTR5-Expression. Davon war die Hälfte der Präparate als schwach positiv, die andere Hälfte als mäßig positiv zu bewerten. Stark positive Tumorschnitte waren bei einem erreichten Höchstwert des IRS-Scores von sechs nicht zu verzeichnen.

Knapp die Hälfte der CCCs konnte als positiv gewertet werden. Davon zeigten vier Tumoren (36,4%) eine schwache und ein Präparat eine mittelmäßige Positivität. Bei letzterem konnte bei einem Schnitt mit einem IRS-Score von acht auch eine stark positive Expression beobachtet werden, die sich jedoch durch Mittelung der Werte relativierte.



A) Mittelgradige SSTR5-Expression in einem HCC **B)** Niedrige SSTR5-Expression in einem CCC

Abbildung 5.23: SSTR5-Expression in Schnitten von einem hepatozellulären Karzinom (HCC) und von einem cholangiozellulären Karzinom (CCC). Immunhistochemie, Gegenfärbung mit Hämatoxylin; Originalvergrößerung: x200 (A) bzw. x400 (B)

5.3.3 CXCR4-Expression

Insgesamt wies über die Hälfte aller Präparate eine CXCR4-Expression auf. Innerhalb der HCCs hielt sich auch hier die Differenz zwischen den IRS-Scores zwischen den verschiedenen Schnitten eines Tumors mit Schwankungen der Werte zwischen drei und sechs in Grenzen. Die Variationsbreite innerhalb der CCCs war auch hier größer. So konnten zum Teil Werte zwischen zwei und zehn innerhalb eines Tumors verzeichnet werden.

Vier HCC-Präparate (22,2%) wiesen ein schwaches Immunsignal auf und ein Drittel der HCCs zeigte eine mäßige Expression des CXCR4. Eine starke Positivität war auch hier bei einem Höchstwert des IRS-Scores von sechs nicht zu beobachten.

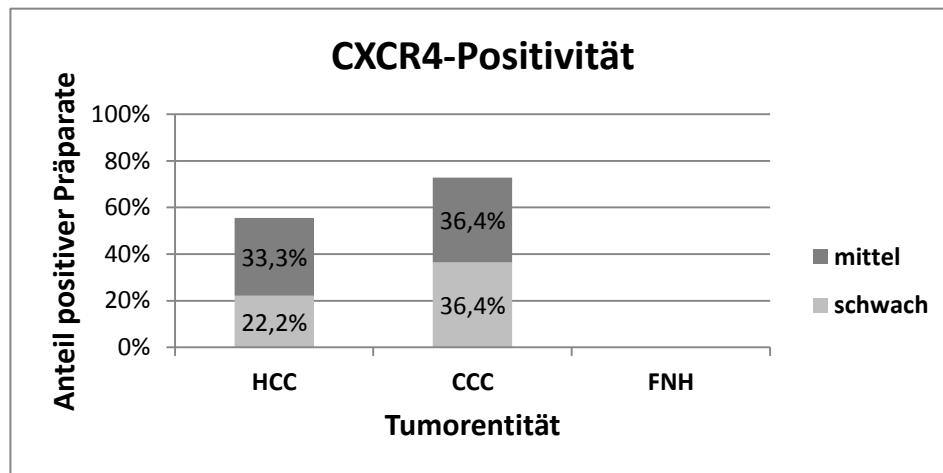
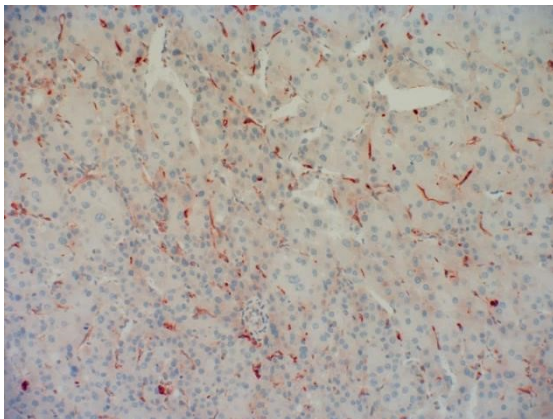


Abbildung 5.24: Positivität für den CXCR4, unterteilt nach den drei Tumorentitäten; HCC = hepatozelluläres Karzinom, CCC = cholangiozelluläres Karzinom, FNH = fokale noduläre Hyperplasie

Bei den CCCs verteilten sich die positiven Präparate zu je 36,4% auf solche mit schwachen und mäßig hohen Werten. Ebenso wie für den SSTR1 und den SSTR5 gab es auch hier punktuell stark positive Abschnitte mit IRS-Scores von acht bis zehn, die sich jedoch in der Gesamtheit der Präparate eines Tumors relativierten.



A) Niedrige CXCR4-Expression in einem HCC **B)** Mittelgradige CXCR4-Expression in einem CCC

Abbildung 5.25: CXCR4-Expression in Schnitten von einem hepatozellulären Karzinom (HCC) und von einem cholangiozellulären Karzinom (CCC). Immunhistochemie, Gegenfärbung mit Hämatoxylin; Originalvergrößerung: x200 (A) bzw. x400 (B)

5.3.4 Expressionsmuster

Im folgenden Abschnitt werden die aufgetretenen Kombinationen in der Expression der verschiedenen Rezeptorsubtypen aufgelistet, um eine eventuelle Häufung von Mustern darzustellen. Als positiv gewertet wurden dabei nur Präparate mit einem IRS-Score von

mindestens 3. Da die FNH-Präparate für alle Rezeptoren durchweg negativ waren, wurden sie hier nicht noch einmal einzeln aufgeführt.

Insgesamt ergaben sich bei den HCC-Patienten sechs verschiedene Rezeptor-Kombinationen. Dabei überwogen mit jeweils 38,9% der Fälle die Präparate ohne jegliche Expression der untersuchten Rezeptoren oder mit alleiniger Positivität für den CXCR4. Bei den restlichen Patienten fanden sich nur jeweils ein Präparat mit einer Positivität für den SSTR2 oder den SSTR3. Eine SSTR5-Expression zeigte sich insgesamt 3 Mal, einmal alleine sowie je einmal in Kombination mit dem SSTR2 oder dem CXCR4. Weiterhin fällt auf, dass sowohl der SSTR1 als auch der SSTR4 in sämtlichen Präparaten negativ waren.

Tabelle 5.1: Expressionsmuster der untersuchten Somatostatin-Rezeptoren und des CXCR4 in den analysierten hepatozellulären Karzinomen (Gesamtzahl der Fälle: n = 18)

SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5	CXCR4	Anzahl der Fälle
-	-	-	-	-	-	7
-	-	-	-	-	+	7
-	-	-	-	+	+	1
-	-	-	-	+	-	1
-	+	-	-	+	-	1
-	-	+	-	-	-	1

Ebenso wie beim HCC ergaben sich auch bei den CCC-Patienten insgesamt sechs verschiedene Rezeptor-Expressions-Kombinationen. Am häufigsten zeigte sich mit 45,5% eine gleichzeitige Expression des SSTR1 und des CXCR4. Diese Kombination kam weiterhin einmal mit zusätzlich positivem SSTR2 vor. Dieser Rezeptor wiederum war insgesamt in 3 Kombinationen jeweils einmal nachweisbar. Die Somatostatin-Rezeptoren 3 und 4 waren in keinem der CCC-Präparate aufzufinden, der SSTR1 war in 4 von 6 Kombinationen vertreten.

Tabelle 5.2: Expressionsmuster der untersuchten Somatostatin-Rezeptoren und des CXCR4 in den analysierten cholangiozellulären Karzinomen (Gesamtzahl der Fälle: n = 11)

SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5	CXCR4	Anzahl der Fälle
+	-	-	-	-	+	5
-	-	-	-	-	-	2
-	-	-	-	-	+	1
+	+	-	-	-	-	1
+	+	-	-	+	-	1
+	+	-	-	-	+	1

5.3.5 Häufigkeitsverteilung

Für die Ermittlung der Häufigkeitsverteilung der Expression der einzelnen Rezeptoren wurden ausschließlich Präparate als Rezeptor-positiv gewertet, deren IRS-Score bei ≥ 3 lag. Die Werte der Einzelschnitte wurden für jeden Tumor gemittelt. Dabei ergaben sich für das HCC folgende Daten: Insgesamt war die Positivität der HCC-Präparate für die untersuchten Rezeptoren eher gering. Keiner der Rezeptoren konnte in mehr als 40% der Tumore nachgewiesen werden. Am häufigsten war mit 38,9% (n=7) der Fälle eine Expression des CXCR4 zu verzeichnen. Für die Somatostatin-Rezeptoren ergab sich folgende Reihenfolge in der Häufigkeit der Expression: SSTR5 > SSTR2 = SSTR3 > SSTR1 = SSTR4, wobei nur jeweils ein Tumor eine SSTR2- oder SSTR3-Expression aufwies und der SSTR1 und der SSTR4 in keinem der untersuchten Tumore nachweisbar waren.

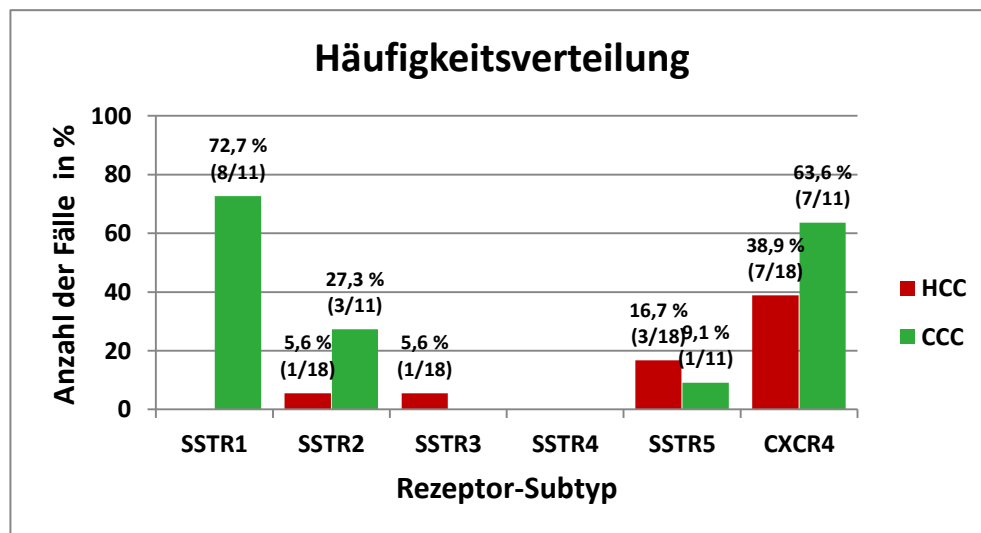


Abbildung 5.26: Häufigkeitsverteilung der untersuchten Rezeptoren, aufgeteilt nach Tumorentitäten. HCC = hepatozelluläres Karzinom, CCC = cholangiozelluläres Karzinom

Im Gegensatz zu den HCC- wiesen die CCC-Präparate häufig eine Expression des SSTR1 auf. Dieser war in 72,7% (n=8) der Fälle nachweisbar, gefolgt vom CXCR4, der in 63,7% (n=7) der Tumore vorgefunden werden konnte. Für die restlichen Rezeptoren ergab sich folgende Reihenfolge in der Häufigkeit der Expression: SSTR2 > SSTR5 > SSTR3 = SSTR4, wobei hier (genauso wie bei den HCC-Präparaten) kein Tumor eine Positivität für den SSTR4 aufwies. Zudem zeigte keines der CCC-Präparate eine Expression des SSTR3.

5.4 Korrelationen zwischen der SSTR- und der CXCR4-Expression und den klinischen Daten

Für die folgenden Korrelationsberechnungen wurde jeweils der Kendall-Tau-b-Test verwendet.

5.4.1 Einfluss des Alters der Patienten auf die SSTR- und CXCR4-Expression

Bei den HCCs wies ausschließlich der IRS-Score für den SSTR1 eine signifikante Korrelation mit dem Alter der Patienten auf ($\pi = 0,474$ und $p = 0,02$). Für alle anderen Rezeptoren lag der Wert für die Signifikanz zwischen $p = 0,061$ und $p = 0,847$ und somit oberhalb des Signifikanzniveaus ($p < 0,05$).

Bei den CCCs konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem IRS-Score für die verschiedenen Rezeptoren und dem Patientenalter aufgezeigt werden ($0,085 < p < 0,527$).

5.4.2 Zusammenhang zwischen der SSTR- und der CXCR4-Expression und dem Grading der Tumore

Zwischen den IRS-Scores für die verschiedenen Rezeptoren und dem histologischen Grading der Tumorproben konnte für die HCCs kein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden ($0,054 < p < 0,773$). Allerdings war für den SSTR4 mit $p = 0,054$ und $\pi = 0,495$ ein Trend zu einer positiven Korrelation erkennbar.

Auch bei den CCCs ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen dem IRS-Score für die Somatostatin-Rezeptoren und dem Tumorigradung ($0,13 < p < 0,64$). Allerdings konnte ein negativer Zusammenhang zwischen der CXCR4-Expression und dem Grading der Tumore nachgewiesen werden ($\pi = - 0,619$; $p = 0,044$).

5.4.3 Zusammenhang zwischen der SSTR- und der CXCR4-Expression und den Serum-AFP-Werten

Zusätzlich wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen den IRS-Scores für die verschiedenen Rezeptoren und dem Alpha-Fetoprotein als Tumormarker für HCCs untersucht. Hierbei ergaben sich jedoch keine signifikanten Werte ($0,448 < p < 0,937$).

5.4.4 Korrelationen zwischen den IRS-Score-Werten der verschiedenen untersuchten Rezeptoren

Weiterhin wurde untersucht, ob die Expressionsintensitäten der einzelnen Rezeptoren innerhalb einer Tumorentität miteinander korrelieren. Hierbei wurden ausschließlich Zusammenhänge mit einem Korrelationskoeffizienten $\tau > 0,2$ sowie einer Signifikanz von $p < 0,05$ als relevant gewertet. Daher sind auch nur diese Werte in den folgender Tabelle aufgelistet.

Hepatozelluläres Karzinom

Bei den hepatozellulären Karzinomen konnten insgesamt vier Rezeptor-Kombinationen identifiziert werden, die signifikant in Bezug auf die Expressionsstärke miteinander korrelierten. Bei allen vier galt das sowohl für den IRS-Score als auch für die IRS-Klassifikation, wobei der Korrelationskoeffizient bei der Klassifikation meist noch höher war. Die stärkste Korrelation ergab sich hierbei zwischen dem IRS-Score des SSTR3 und dem des SSTR4 ($\tau = 0,686$) und in der IRS-Klassifikation zwischen den Werten für den SSTR1 und den SSTR2 ($\tau = 0,791$).

Tabelle 5.3: Korrelationen zwischen den IRS-Scores bzw. den IRS-Klassifikationen der verschiedenen untersuchten Rezeptoren in hepatozellulären Karzinomen

	IRS-Score	IRS-Klassifikation
SSTR1 – SSTR2	$\tau = 0,582$ $p = 0,01$	$\tau = 0,791$ $p = 0,001$
SSTR1 – SSTR5	$\tau = 0,648$ $p = 0,004$	$\tau = 0,73$ $p = 0,002$
SSTR3 – SSTR4	$\tau = 0,686$ $p = 0,005$	$\tau = 0,686$ $p = 0,005$
SSTR4 – SSTR5	$\tau = 0,555$ $p = 0,016$	$\tau = 0,639$ $p = 0,007$

Cholangiozelluläres Karzinom

Bei den CCCs fanden sich weder für den IRS-Score noch für die IRS-Klassifikation signifikante Korrelationen zwischen den Expressionsstärken der einzelnen Rezeptorsubtypen.

5.5 Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Entitäten

Im folgenden Abschnitt wurde untersucht, ob es signifikante Unterschiede bezüglich der Rezeptorexpression zwischen den einzelnen Tumorentitäten gibt. Auch hier wurde dazu der IRS-Score herangezogen. Der Vergleich wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. Die Ergebnisse wurden für jeden Rezeptor zum einen in tabellarischer Form, zum anderen graphisch anhand eines Boxplots dargestellt. Da die Expression sämtlicher Rezeptoren bei den FNH-Patienten negativ war, wurde hier auf einen Einzelvergleich mit den jeweiligen Entitäten verzichtet. Der Vollständigkeit halber wurden sie jedoch in den Boxplots mit aufgeführt.

SSTR1

Tabelle 5.4: Vergleich zwischen den hepatozellulären Karzinomen und den cholangiozellulären Karzinomen bezüglich der SSTR1-Expression mittels Mann-Whitney-U-Test

	Test	p	U
IRS-Score	4,500	< 0,001	- 4,657

Bezüglich des SSTR1 konnte für den IRS-Score ein signifikanter Unterschied zwischen den HCC- und den CCC-Präparaten nachgewiesen werden. Der Median für die CCCs lag mit einem Wert von 4 deutlich höher als für die HCC-Präparate. Dafür wiesen die CCC-Präparate einen größeren Interquartilsabstand und eine größere Spannweite auf.

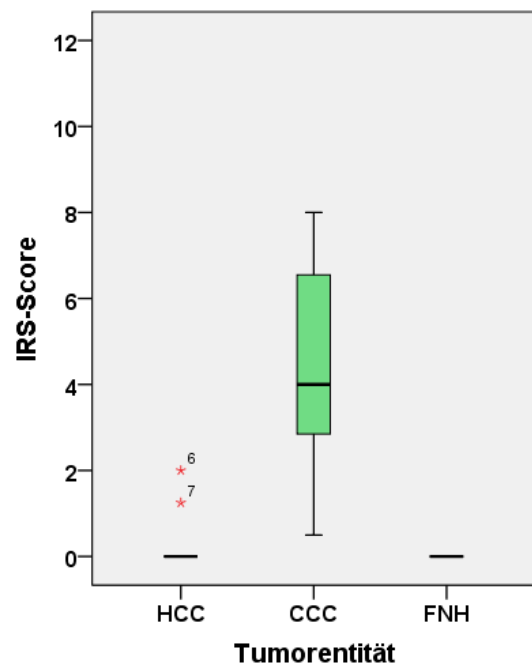


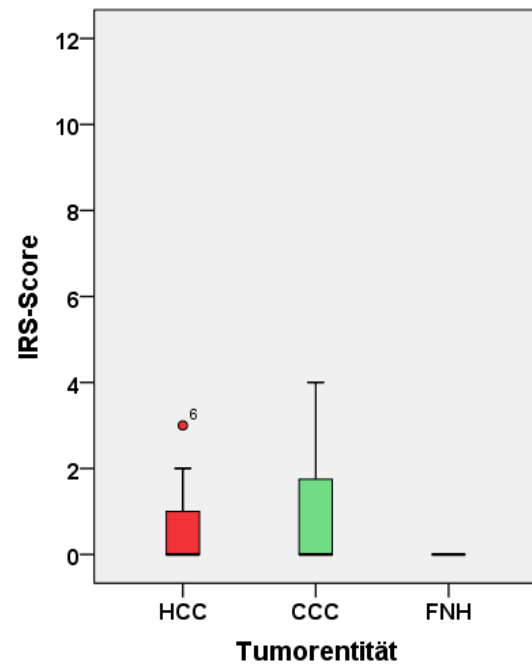
Abbildung 5.27: IRS-Scores für die SSTR1-Expression, unterteilt nach den drei untersuchten Tumorentitäten; dargestellt ist der Median, das obere und untere Quartil, der Maximal- und der Minimalwert sowie Ausreißer; HCC = hepatozelluläres Karzinom, CCC = cholangiozelluläres Karzinom, FNH = fokale noduläre Hyperplasie

SSTR2

Tabelle 5.5: Vergleich zwischen den hepatozellulären Karzinomen und den cholangiozellulären Karzinomen bezüglich der SSTR2-Expression mittels Mann-Whitney-U-Test

	Test	p	U
IRS-Score	83,500	0,424	- 0,799

Abbildung 5.28: IRS-Scores für die Expression des SSTR2, unterteilt nach den drei untersuchten Tumorentitäten; dargestellt ist der Median, das obere und untere Quartil, der Maximal- und der Minimalwert sowie Ausreißer; HCC = hepatozelluläres Karzinom, CCC = cholangiozelluläres Karzinom, FNH = fokale noduläre Hyperplasie



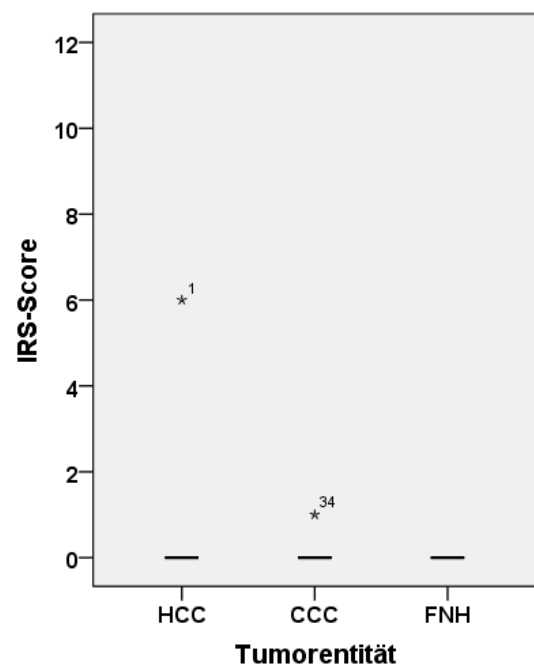
Beim SSTR2 ließ sich für den IRS-Score kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Tumorentitäten feststellen. Im Boxplot liegt der Median bei allen Entitäten auf gleicher Höhe (IRS = 0). Die Spannweite und der Interquartilsabstand sind bei den CCCs jeweils etwas größer als bei den HCCs.

SSTR3

Tabelle 5.6: Vergleich zwischen den hepatozellulären Karzinomen und den cholangiozellulären Karzinomen bezüglich der SSTR3-Expression mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests

	Test	p	U
IRS-Score	96,000	0,759	- 0,307

Abbildung 5.29: IRS-Scores für die Expression des SSTR3, unterteilt nach den drei untersuchten Tumorentitäten; dargestellt ist der Median, das obere und untere Quartil, der Maximal- und der Minimalwert sowie Ausreißer; HCC = hepatozelluläres Karzinom, CCC = cholangiozelluläres Karzinom, FNH = fokale noduläre Hyperplasie



Da beim SSTR3 in kaum einem Präparat eine Rezeptorexpression nachgewiesen werden konnte, ergab sich auch kein signifikanter Unterschied zwischen den HCCs und den CCCs. Die Mediane der IRS-Scores liegen für alle 3 Tumorentitäten bei 0.

SSTR4

Für den SSTR4 ergab sich ein ähnliches Bild wie für den SSTR3, da auch hier kaum ein Präparat eine Rezeptorexpression aufwies. Daher gab es auch hier keinen signifikanten Unterschied zwischen den HCCs und den CCCs.

Tabelle 5.7: Vergleich zwischen den hepatozellulären Karzinomen und den cholangiozellulären Karzinomen bezüglich der SSTR4-Expression mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests

	Test	p	U
IRS-Score	88,000	0,260	- 1,126

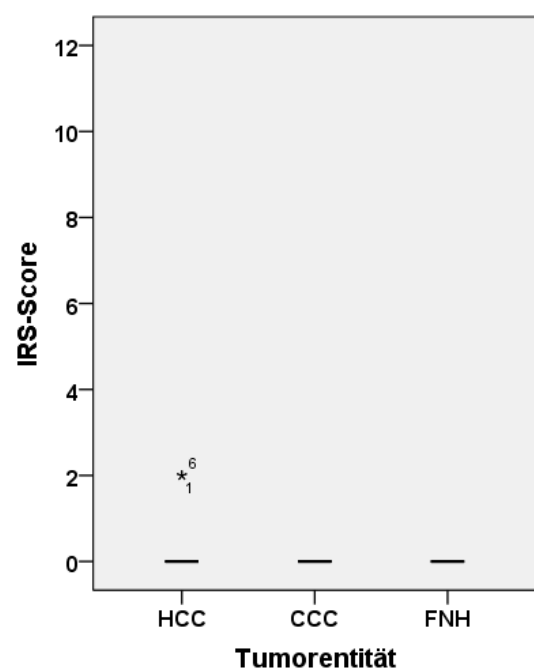


Abbildung 5.30: IRS-Scores für die SSTR4-Expression, unterteilt nach den drei untersuchten Tumorentitäten; dargestellt ist der Median, das obere und untere Quartil, der Maximal- und der Minimalwert sowie Ausreißer; HCC = hepatozelluläres Karzinom, CCC = cholangiozelluläres Karzinom, FNH = fokale noduläre Hyperplasie

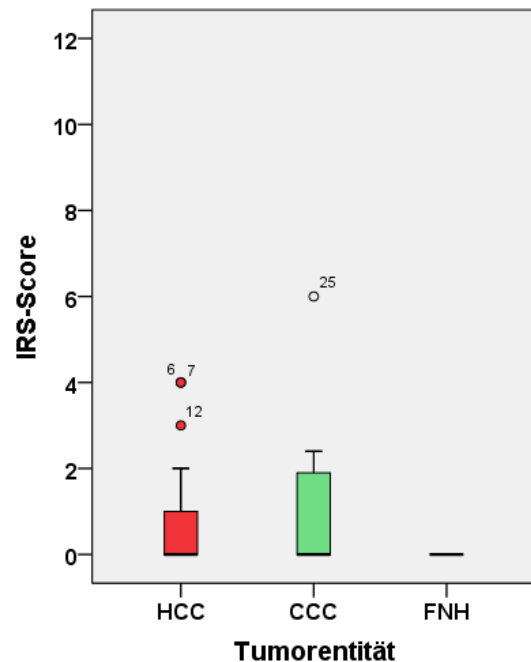
SSTR5

Auch beim SSTR5 liegen die Mediane der Tumorentitäten auf demselben niedrigen Niveau (IRS = 0). Die Spannweite und der Interquartilsabstand sind bei den CCCs abermals etwas größer als bei den HCCs, sie unterscheiden sich jedoch nicht wesentlich. Auch hier konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den HCCs und den CCCs festgestellt werden.

Tabelle 5.8: Vergleich zwischen den hepatozellulären Karzinomen und den cholangiozellulären Karzinomen bezüglich der SSTR5-Expression mittels Mann-Whitney-U-Test

	Test	p	U
IRS-Score	67,000	0,141	- 1,471

Abbildung 5.31: IRS-Scores für die Expression des SSTR5, unterteilt nach den drei untersuchten Tumorentitäten; dargestellt ist der Median, das obere und untere Quartil, der Maximal- und der Minimalwert sowie Ausreißer; HCC = hepatozelluläres Karzinom, CCC = cholangiozelluläres Karzinom, FNH = fokale noduläre Hyperplasie

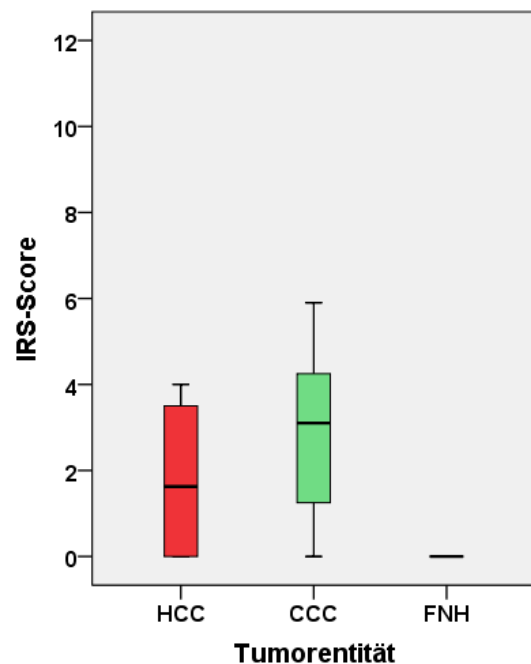


CXCR4

Tabelle 5.9: Vergleich zwischen den hepatozellulären Karzinomen und den cholangiozellulären Karzinomen bezüglich der CXCR4-Expression mittels Mann-Whitney-U-Test

	Test	p	U
IRS-Score	83,500	0,411	- 0,822

Abbildung 5.32: IRS-Scores für die CXCR4-Expression, unterteilt nach den drei untersuchten Tumorentitäten; dargestellt ist der Median, das obere und untere Quartil, der Maximal- und der Minimalwert sowie Ausreißer; HCC = hepatozelluläres Karzinom, CCC = cholangiozelluläres Karzinom, FNH = fokale noduläre Hyperplasie



Im Boxplot für den CXCR4 liegen die Mediane – mit 3 für die CCCs und 1,5 für die HCCs – zwar auf unterschiedlicher Höhe, allerdings ist dieser Unterschied statistisch nicht signifikant. Die HCC-Präparate zeigten hier den größeren Interquartilsabstand, die Werte der CCC-Präparate weisen dagegen die größere Spannweite auf.

Ki-67-Index

Des Weiteren wurde untersucht, ob es Unterschiede hinsichtlich des Ki-67-Index zwischen den einzelnen Tumorentitäten gibt. Dazu wurde ebenfalls der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Wie in der Tabelle zu erkennen ist, konnte dabei kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Tabelle 5.10: Vergleich zwischen den hepatozellulären Karzinomen und den cholangiozellulären Karzinomen bezüglich der CXCR4-Expression mittels Mann-Whitney-U-Test

	Test	p	U
Ki-67-Index	74,000	0,260	- 1,126

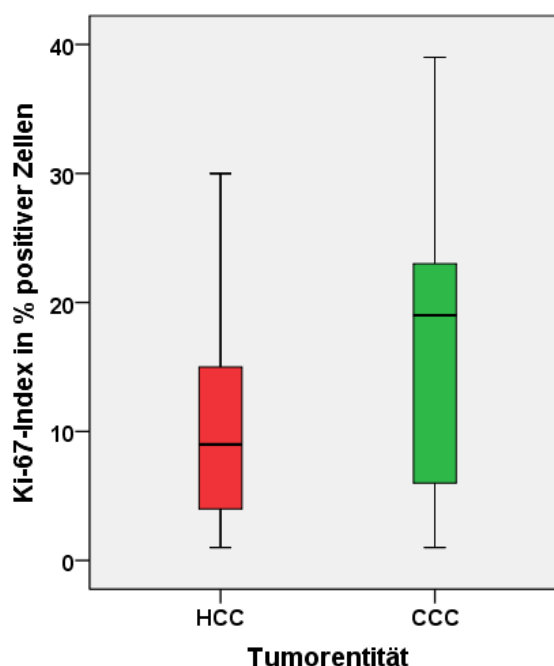


Abbildung 5.33: Ki-67-Index, unterteilt nach den drei untersuchten Tumorentitäten; dargestellt ist der Median, das obere und untere Quartil, der Maximal- und der Minimalwert sowie Ausreißer; HCC = hepatozelluläres Karzinom, CCC = cholangiozelluläres Karzinom, FNH = fokale noduläre Hyperplasie

5.6 Zusammenhang zwischen der Ki-67 Expression und der Expression der untersuchten Rezeptoren und den klinischen Daten

Weiterhin wurden die Ergebnisse mit Hilfe des Spearman-Rho-Tests auf signifikante Korrelationen zwischen dem Ki-67-Index und der SSTR- bzw. CXCR4-Expression hin untersucht. Dabei konnten jedoch sowohl für die HCCs ($0,102 < p < 0,692$) als auch für die CCCs ($0,100 < p < 1,000$) keine signifikanten Zusammenhänge festgestellt werden. Allerdings konnte für die HCCs eine signifikante Korrelation zwischen der Ki-67-Expression und den Serumwerten des Tumormarkers AFP aufgezeigt werden ($p = 0,583$; $p = 0,018$).

5.7 CXCR4- und SSTR5-Expression in Tumorgefäßen

Bei der histologischen Auswertung der Expression des SSTR5 und des CXCR4 in den verschiedenen Tumorschnitten konnte unabhängig von der Anfärbung der Tumorzellen eine starke Positivität der Tumorgefäße verzeichnet werden. 53,3% der HCC-Präparate und 70% der CCC-Präparate wiesen eine vaskuläre CXCR4-Expression, 20% der HCC-Präparate und 40% der CCC-Präparate eine vaskuläre SSTR5-Expression auf. Während in der statistischen Auswertung kein Einfluss der SSTR5-Expression der Tumorgefäße auf das Überleben der Patienten nachzuweisen war, zeigte sich für den CXCR4 ein anderes Bild. Hier konnte in den Kaplan-Meier-Kurven ein signifikanter Unterschied für das Überleben zwischen Patienten mit einer CXCR4-Positivität und solchen mit einer CXCR4-Negativität der Tumorgefäße beobachtet werden. Es zeigte sich eine deutlich geringe Überlebenszeit für HCC-Patienten mit CXCR4-positiven Gefäßen in den Tumoren (Log-Rank-Test: $p = 0,029$). Das mediane Überleben bei CXCR4-Positivität betrug 10 Monate gegenüber 37 Monaten bei CXCR4-Negativität. Eine ähnliche Tendenz war bei den CCC-Patienten zu verzeichnen, hier allerdings ohne Signifikanz (Log-Rank-Test: $p = 0,096$).

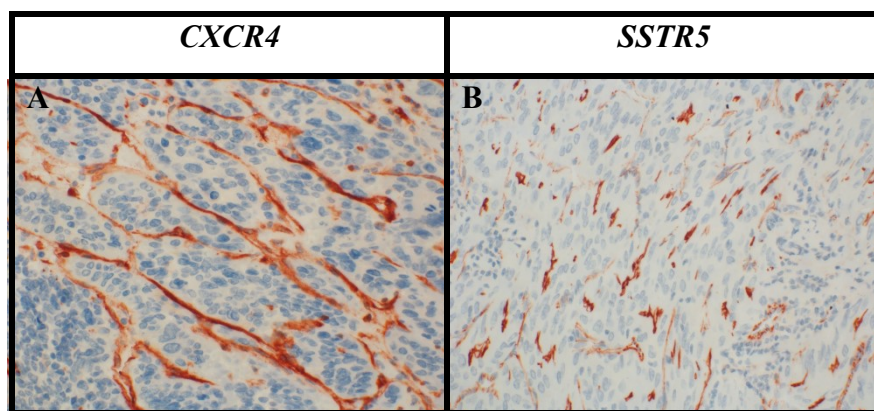
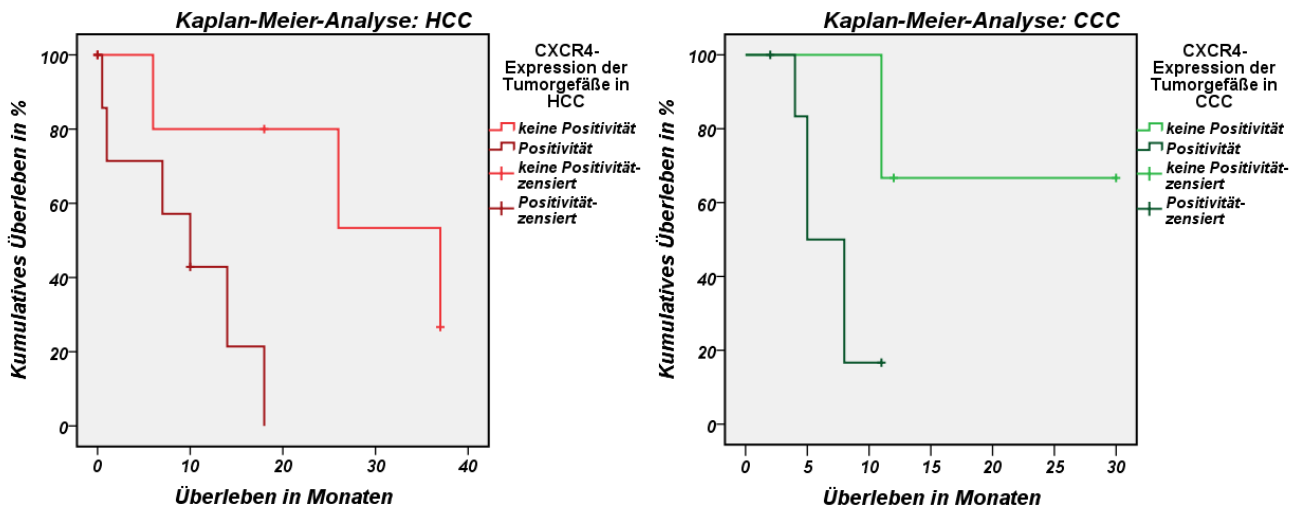


Abbildung 5.34: Expression des CXCR4 (A) und des SSTR5 (B) in den Tumorgefäßen eines HCC. Immunhistochemie (rotbraune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin, Originalvergrößerung: x400



Abbildungen 5.35 und 5.36: Darstellung des kumulativen Überlebens von Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom (HCC; links) bzw. von Patienten mit einem cholangiozellulären Karzinom (CCC; rechts) mit entweder negativer oder positiver CXCR4-Expression in den Tumorgefäßen anhand von Kaplan-Meier-Kurven (Log-Rank-Test: $p = 0,029$ (HCC); $p = 0,096$ (CCC))

Des Weiteren wurden die Tumore, abhängig vom Vorhandensein der vaskulären CXCR4-Expression in 2 Gruppen unterteilt und mittels Mann-Whitney-U-Test bezüglich der klinischen Daten miteinander verglichen. Hierbei zeigte sich ein tendenzieller Zusammenhang zwischen der CXCR4-Positivität in den Tumorgefäßen und dem Ausmaß der Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 für beide Tumorentitäten, allerdings ohne statistische Signifikanz (HCC: $p = 0,129$; CCC: $p = 0,106$). Tumoren mit einer vaskulären CXCR4-Expression wiesen hierbei einen höheren Ki-67-Index auf als solche mit CXCR4-Negativität. Gleiches war für den Tumormarker AFP zu beobachten (HCC: $p = 0,129$).

6. Diskussion

6.1 Patientendaten

Bei den von uns untersuchten HCC-Patienten lag das Durchschnittsalter bei Diagnosestellung bei 68 Jahren, womit diese etwas jünger waren als das in der Literatur für die europäische Bevölkerung angegebene typische Erkrankungsalter von über 75 Jahren (El-Serag und Rudolph 2007). Die CCC-Patienten wiesen ein durchschnittliches Erkrankungsalter von 68,5 Jahren auf, was mit den Angaben von Khan et al. (2012) und von Soares et al. (2014) korreliert. Zudem waren bei beiden Tumorentitäten mehr Männer als Frauen erkrankt (Verhältnis HCC etwa 2,5:1 und bei CCC etwa 4,5:1), was ebenfalls mit den Daten aus der Literatur übereinstimmt (Chuang et al. 2009, El-Serag und Rudolph 2007, Khan et al. 2012).

Die meisten der in der vorliegenden Studie eingeschlossenen Patienten befanden sich zum Diagnosezeitpunkt in einem T1- oder T2-Stadium (siehe Abbildungen 5.3 und 5.4). Eine lymphogene und auch eine hämatogene Metastasierung hatten zu diesem Zeitpunkt in den meisten Fällen noch nicht stattgefunden. Diese Angaben zeigen, dass sich die Mehrheit der von uns untersuchten Tumore in einem vergleichsweise noch recht frühen Stadium befand. Dies ist im Allgemeinen eher seltener der Fall, da Lebertumore aufgrund der erst spät auftretenden klinischen Beschwerden häufig nur in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert werden (Khan et al. 2012, Rizvi und Gores 2013). Auf der Grundlage dieser Daten würde man demnach auch eine etwas höhere mittlere Überlebenszeit, als sie üblicherweise in der Literatur für HCC-Patienten angegeben wird, erwarten.

In der vorliegenden Untersuchung betrug die mediane Überlebenszeit bei den HCC-Patienten 14 Monate. Nach den Angaben von de Lope et al. (2012) beträgt die Überlebenszeit bei HCC-Patienten zwischen 3 Monaten und 3 Jahren, abhängig vom BCLC-Stadium. Anhand der uns vorliegenden Patientendaten ist eine nachträgliche Einordnung der Fälle in das BCLC-System nur beschränkt möglich. Sicher ist jedoch, dass die Patienten entweder mittels operativer Therapie oder transarterieller Chemoembolisation behandelt wurden, was nach der aktuellen Behandlungsleitlinie für ein überwiegendes Vorliegen der BCLC-Stufen A und B bei den von uns analysierten Fällen spräche. Für diese Patienten werden in der Literatur mittlere Überlebensraten von mindestens 24 Monaten nach durchgeführter Therapie und von 16 Monaten ohne Therapie angegeben (de Lope et al. 2012). Damit liegt der Durchschnitt der Patienten, die in unserer Studie untersucht wurden, trotz durchgeführter operativer Therapie deutlich darunter. Ein anderes Bild ergibt sich jedoch, wenn man die Daten mit denen der

Metaanalyse von Ji et al. (2011) vergleicht, in welcher 11 Studien zusammengefasst wurden, die die Wirksamkeit einer Behandlung von HCC-Patienten mit Somatostatinanaloga (größtenteils Octreotid (7/11), teils in Kombination mit Lanreotid (2/11), selten Lanreotid-Monotherapie (2/11)) gegenüber einer Kontrollgruppe untersucht haben. Die Kontrollgruppe erhielt dabei ein Placebo-Präparat oder erfuhr keine Behandlung. In der Metaanalyse wird zwar nicht das BCLC-Stadium, dafür jedoch das Okuda-Stadium sowie der Child-Pugh-Score angegeben, was die Ergebnisse annähernd vergleichbar macht. Tabelle 6.1 gibt eine Übersicht über die analysierten Studiendaten. Am ehesten vergleichbar mit unseren Überlebensdaten sind die Studien von Yuen et al. (2002), Becker et al. (2007) und Barbare et al. (2009), da in diesen ebenfalls hauptsächlich Patienten mit niedrigen Tumorstadien (Okuda-Stadium I-II) eingeschlossen wurden (Barbare et al. 2009, Becker et al. 2007, Ji et al. 2011, Yuen et al. 2002). In der Gegenüberstellung zwischen diesen Studien und unseren Daten fällt auf, dass das mediane Überleben der in der vorliegenden Arbeit eingeschlossenen Patienten mit 14 Monaten deutlich sowohl über dem der Octreotid-Gruppen, als auch dem der Kontroll-Gruppen aller Studien lag.

Für die CCC-Patienten war das in der vorliegenden Untersuchung ermittelte durchschnittliche Überleben von 8 Monaten ebenfalls niedriger als in der Literatur angegeben (24 Monate nach Khan et al. 2012). In der Literatur wird jedoch nur selten Bezug auf das TNM-Stadium genommen. Zudem ist das Überleben davon abhängig, ob es sich um ein intrahepatisches, perihiläres oder distales Gallengangskarzinom handelt, da die jeweiligen Lokalisationen der Tumore andersartige Therapieoptionen und damit eine unterschiedliche Prognose bedingen (Razumilava und Gores 2014). Genauere Angaben hierzu sind in der Literatur jedoch nicht zu finden. Die Diskrepanz zwischen unseren Daten bezüglich des Überlebens der Patienten und den wenigen Angaben in der Literatur ist aber unter anderem auch durch die relativ kleine Patientenzahl in der vorliegenden Untersuchung zu erklären.

Tabelle 6.1: Metaanalyse von Studien zur Wirksamkeit von Somatostatinanaloga (Octreotid und/oder Lanreotid) gegenüber einer Kontrollgruppe bei Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom modifiziert nach Ji et al. (2011); O = Octreotid-Gruppe, K = Kontrollgruppe

<i>Studie (Jahr)</i>	<i>Anzahl d. Patienten (O vs. K)</i>	<i>Art der Kontrolle</i>	<i>Child-Pugh- Klassifikation</i>	<i>Okuda- Stadium</i>	<i>medianes Überleben in Monaten</i>
Kouroumalis (1998)	28 vs. 30	keine Therapie	O: (A:1, B:10, C:13) K: (A:2, B:12, C:16)	O: (I:2, II:13, III:13) K: (I:3, II:10, III:17)	O: 13,0 K: 4,0
Farooqi (2000)	6 vs. 7	keine Therapie	keine Angaben	keine Angaben	keine Angaben
Wu (2001)	12 vs. 13	keine Therapie	keine Angaben	O: (III:12) K: (III:13)	O: 5,7 K: 1,6
Yuen (2002)	35 vs. 35	Placebo	O: (A:18, B:14, C:3) K: (A:12, B:22, C:1)	O: (I:6, II:23, III:6) K: (I:3, II:26, III:6)	O: 1,93 K: 1,97
Yang (2003)	32 vs. 33	keine Therapie	O: (B-C:32) K: (B-C:33)	O: (II-III:32) K: (II-III:33)	O: 11,6 K: 5,6
Zhang (2004)	20 vs. 25	keine Therapie	keine Angaben	keine Angaben	O: 7,0 K: 4,0
Becker (2007)	60 vs. 59	Placebo	O: (A:53, B:35, C:12) K: (A:53, B:37, C:10)	O: (I:30, II:65, III:5) K: (I:32, II:58, III:10)	O: 4,7 K: 5,3
Dimitroupoulos (2007)	30 vs. 30	Placebo	O: (A:15, B:15) K: (A:11, B:19)	keine Angaben	O: 11,4 K: 6,5
Ou (2007)	16 vs. 14	keine Therapie	keine Angaben	O: (III:16) K: (III:14)	O: 7,0 K: 2,5
Barbare (2009)	135 vs. 137	Placebo	O: (A:90, B:34, C:1) K: (A:93, B:32, C:2)	keine Angaben	O: 6,53 K: 7,03
Zhang (2010)	21 vs. 24	keine Therapie	keine Angaben	keine Angaben	O: 8,0 K: 3,0

Ein weiterer wichtiger Faktor zeigt sich in der Korrelation zwischen dem Proliferationsmarker Ki-67 und dem medianen Überleben. Patienten mit einem hohen Ki-67-Index wiesen ein deutlich niedrigeres Überleben als solche mit geringeren Ki-67-Werten auf. Daraus lässt sich gut ableiten, dass die voraussichtliche Überlebensdauer stark vom Ausmaß der Aggressivität des Tumors abhängig ist, welche durch den Ki-67-Index repräsentiert wird (Scholzen und Gerdes 2000). Hiermit ist auch zum Teil das geringere mediane Überleben der CCC-Patienten im Vergleich zu den HCC-Patienten in der vorliegenden Untersuchung zu erklären, da erstere einen höheren Ki-67-Index aufwiesen. Insgesamt ist jedoch festzuhalten, dass vor allem die HCC-Präparate im Vergleich zu anderen aggressiven Tumorentitäten wie kleinzelligen Bronchialkarzinomen (Neubauer et al. 2016) einen doch relativ niedrigen Ki-67-Index aufzeigten. Dies macht deutlich, dass allein durch die Analyse der Expression von Proliferationsmarkern keine absoluten prognostischen Aussagen gemacht werden können, da deren Expressionsrate sich zwischen verschiedenen Tumorentitäten deutlich unterscheidet. Hierzu müssen zusätzlich weitere laborchemische Werte wie Tumormarker und Organfunktionsparameter sowie andere Begleiterkrankungen und der Allgemeinzustand der Patienten herangezogen werden.

6.2 Rezeptorexpression in den hepatozellulären Karzinomen

In der Literatur finden sich ausgesprochen unterschiedliche Angaben zu den Expressionshäufigkeiten der verschiedenen SSTRs in HCCs. Insgesamt wird jedoch mit Ausnahme des SSTR4 für alle SSTRs eine Expression in über 40% der Fälle beschrieben, wobei die Spannweite zwischen den verschiedenen Literaturangaben von 40% bis 76% reicht (Blaker et al. 2004, Koc et al. 2013, Li et al. 2005, Reynaert et al. 2004, Verhoef et al. 2008). Im Vergleich zu diesen Daten zeigten die Tumorproben der HCC-Patienten in unserer Untersuchung für alle SSTRs eine deutlich geringere Expressionsrate. Der am häufigsten exprimierte SSTRs war der SSTR5, der in 16,7% der Fälle in einer schwachen bis mittelstarken Expressionsstärke nachgewiesen werden konnte. Ebenso wie in den oben genannten Studien war in der vorliegenden Untersuchung eine Expression des SSTR4 nicht zu verzeichnen. Auch der SSTR1 war in den analysierten HCC-Proben nicht nachweisbar. Insgesamt ergab sich in Bezug die untersuchten HCC-Präparate die folgende Häufigkeitsverteilung in der Expression der SSTRs: $SSTR5 > SSTR2 = SSTR3 > SSTR1 = SSTR4$. Hierbei ist zu beachten, dass in der vorliegenden Arbeit die Auswertung der Rezeptorexpression in den einzelnen Tumorproben mit Hilfe des IRS-Scores erfolgte und ein

Präparat erst ab einem IRS-Score von ≥ 3 als positiv gewertet wurde. Dieser bezieht sowohl die Intensität der Färbung als auch den prozentualen Anteil an gefärbten Tumorzellen in die Bewertung mit ein. In der Literatur finden sich zur Art und Weise der Auswertung immunhistochemischer Färbungen keine Angaben. Aus den meisten Studien zur Untersuchung der SSTR-Expression in HCC geht nicht hervor, ob ein Score verwendet wurde bzw. ab wann bestehende Färbungen als positiv angesehen wurden.

Der mit Abstand am häufigsten exprimierte Rezeptor war in den in der vorliegenden Arbeit analysierten HCC-Proben der CXCR4. Knapp 40% der Präparate zeigten eine Expression dieses Rezeptors. Aber auch hier fiel die Expressionsrate geringer aus, als in der Literatur angegeben. So veröffentlichten Liu et al. 2008 eine Studie, in welcher 88% der untersuchten HCC-Gewebeproben eine CXCR4-Expression aufwiesen (Liu et al. 2008). Allerdings sind auch hier die Ergebnisse in der Literatur nicht einheitlich. Während zum Beispiel Schimanski et al. (2006) und Li et al. (2007) einen signifikanten Unterschied zwischen der CXCR4-Expression in HCCs und normalem Lebergewebe beschrieben, konnte eine Forschergruppe um Rubie et al. (2006) keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Genexpression des CXCR4 zwischen dem Karzinom und dem benachbarten Lebergewebe feststellen (Li et al. 2007, Rubie et al. 2006, Schimanski et al. 2006). Analog zur Auswertung der SSTRs wurde auch die Auswertung der CXCR4-Expression mit Hilfe des IRS-Scores vorgenommen. In der Literatur gibt auch hier so gut wie keine Angaben darüber, wie die CXCR4-Expression in den Präparaten ausgewertet wurde und anhand welcher Kriterien die Autoren ein Präparat als positiv oder negativ bewertet haben. Dies könnte unter anderem auch die Diskrepanz in den Rezeptorexpressionsraten zwischen unseren Untersuchungen und den Literaturangaben erklären.

Insgesamt ist zu festzuhalten, dass die SSTR- und CXCR4-Expression in unserer Kohorte von HCC-Patienten deutlich geringer war, als in der Literatur angegeben. Neben der oben beschriebenen Problematik der uneinheitlichen Auswertungskriterien sind zahlreiche weitere Gründe hierfür zu diskutieren. Eine Ursache für die Diskrepanzen könnte die insgesamt doch geringe Anzahl an Patienten darstellen. Des Weiteren wurde bereits 2011 von Ji et al. eine Metaanalyse veröffentlicht, welche darauf schließen lässt, dass ethnische und ätiologische Unterschiede einen großen Einfluss auf die SSTR-Expression haben könnten. In dieser Analyse wurde der Benefit einer SSA-Behandlung an Patienten mit HCCs in fortgeschrittenem Stadium gegenüber einer Kontrollgruppe (Placebo oder keine Behandlung) untersucht. In den fünf Studien aus China konnte dabei ein deutlicher Gewinn an

Lebenserwartung verzeichnet werden, wohingegen die vier Studien aus westlichen Ländern keinen Unterschied zwischen der Octreotid- und der Placebo-Gruppe aufzeigen konnten (Ji et al. 2011). Diese divergenten Ergebnisse zwischen den verschiedenen Studien können zum einen durch die ethnische Herkunft der Patienten, zum anderen aber auch durch die den hepatozellulären Karzinomen zugrundeliegende Ätiologie hervorgerufen worden sein. So entstehen in den westlichen Ländern die meisten hepatozellulären Karzinome auf dem Boden einer alkoholtoxisch bedingten Leberzirrhose, während im asiatischen Raum häufig eine Hepatitis-B- oder -C-Erkrankung ursächlich ist. Die Studie von Ji et al. (2011) legt die Vermutung nahe, dass es hinsichtlich der SSTR-Expression in HCC Unterschiede je nach der Ursache der Tumorentstehung gibt. Allerdings existiert bislang nur eine einzige Studie (Dimitroulopoulos et al. 2002), in welcher die SSTR-Expression in den Tumoren vor der Octreotidgabe untersucht wurde. In dieser konnte das Überleben bei Patienten mit SSTR-positiven Tumoren durch Octreotid signifikant verlängert werden. Insgesamt wird hier deutlich, dass HCCs einen unterschiedlichen Besatz an SSTRs aufweisen können und eine dahingehend zielgerichtete Therapie auch nur bei bestimmten SSTR-Expressions-Konstellationen wirkt. Bereits 2008 veröffentlichten Samonakis et al. einen kritischen Kommentar, der sich unter anderem mit dieser Problematik befasst und in welchem der bisher übliche Studienaufbau bei Untersuchungen zur Wirksamkeit von SSA in HCCs in Frage gestellt wird. Zum einen beschreiben sie, dass die Gabe von SSA über mindestens sechs Monate durchgeführt werden sollte, um überhaupt einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe zeigen zu können. Allerdings liegt das durchschnittliche Überleben in einigen dieser Studien bei unter sechs Monaten, wodurch die Aussagekraft der Untersuchungen eher begrenzt ist. Zum anderen benennen sie das Problem der unterschiedlichen Dosierung und Verabreichung der SSA, da es bisher kein einheitliches Schema gibt. Die Autorengruppe stellte zudem fest, dass ein offensichtlicher Benefit nur bei etwa 40% der Patienten eintrat (Samonakis et al. 2008). Dies korreliert mit den in den Studien von Blaker et al. (2004) und Reubi et al. (1999) angegebenen SSTR-Expressionsraten in HCCs (Blaker et al. 2004, Reubi et al. 1999). Bedeutsam sind hierbei vor allem die Expressionsraten des SSTR2 (41% bei Blaker et al. (2004)), da in den meisten Studien zur Wirksamkeit von SSA Octreotid (selten auch Lanreotid) zum Einsatz kam. In der Studie von Reubi et al. wurde nicht zwischen den einzelnen SSTRs differenziert, es wurde lediglich eine Gesamtexpression aller SSTRs von 41% angegeben und die Vermutung geäußert, dass es sich dabei vor allem um den SSTR2 handelt, da das in dieser Studie für die Untersuchung verwendete Octreotid vorwiegend an diesen Rezeptor bindet (Reubi et al. 1999). Daher fordert die Gruppe um Samonakis, in

zukünftigen Untersuchungen zur Wirksamkeit von SSA bei HCCs, ähnlich wie in der Studie von Dimitroulopoulos et al. (2002), die geeigneten Patienten durch ein vorheriges „SSTR-Mapping“ auszuwählen, also den Rezeptorbesatz des Tumors vor der Gabe der SSA zu untersuchen, um die Aussagekraft zu verbessern (Samonakis et al. 2008).

Die Mehrzahl der immunhistochemischen Studien, die bisher in Bezug auf eine SSTR-Expression in HCCs durchgeführt worden war, erfolgte unter Verwendung von polyklonalen Antikörpern. Diese besitzen jedoch im Gegensatz zu den monoklonalen Antikörpern, die in der vorliegenden Untersuchung verwendet wurden, eine deutlich geringere Spezifität. Durch das stärkere Auftreten von unspezifischen Färbungen bei der Verwendung von polyklonalen Antikörpern kann es zu einer Überschätzung der Rezeptorexpression kommen (Kaemmerer et al. 2013). Auch dies könnte ein Grund für die unterschiedlichen Rezeptorexpressionsraten zwischen unserer Untersuchung und den Literaturangaben sein.

6.3 Rezeptorexpression in den cholangiozellulären Karzinomen

Die Tumorproben der CCC-Patienten zeigten insgesamt eine etwas höhere Expressionsrate der SSTRs als die der HCC-Patienten. Dies galt insbesondere für den SSTR2 und den SSTR5. Der wichtigste Unterschied zwischen den beiden Tumorentitäten war jedoch die SSTR1-Expression. Während bei den HCCs keines der Präparate eine Positivität mit einem IRS-Score ≥ 3 für diesen Rezeptor zeigte, war der SSTR1 mit einer Expression in 72,7% der Fälle der am häufigsten exprimierte Rezeptor in den Tumorschnitten der CCCs. Sieben der acht positiven Präparate zeigten dabei sogar eine mittelstarke Expression. Da es in der Literatur bisher keine prozentualen Angaben zur Expression von SSTRs in CCCs gibt, ist dies die erste Studie, in welcher CCCs auf das Auftreten der einzelnen SSTR-Subtypen hin untersucht wurden. Zhao et al. veröffentlichten 2002 eine Arbeit, in der ein positiver Effekt einer Therapie mit Octreotid bei CCC-Patienten beobachtet werden konnte. In dieser Studie wurde jedoch nur die SSTR2-mRNA mittels PCR nachgewiesen (Zhao et al. 2002). In unserer Untersuchung zeigten hingegen der SSTR1 und der SSTR5 noch höhere Expressionsraten als der SSTR2. Dies lässt die Vermutung zu, dass das neuere Somatostatinanalogon Pasireotid eine stärkere Wirkung zeigen könnte, da es im Gegensatz zu Octreotid ein breiteres Wirkspektrum aufweist und auch an den SSTR1 bindet. Dieser Aspekt sollte in künftigen Studien zur Wirksamkeit von SSA auch bei Patienten mit einem CCC stärker bedacht werden.

Im Vergleich zu den HCC-Präparaten war auch die CXCR4-Expression bei den CCCs mit insgesamt 63,6% positiven Proben etwas höher. Ebenso wie für die SSTRs gibt es auch für den CXCR4 kaum Daten über seine Expression in CCCs. Ehling et al. (2015) sprechen zwar von einer hohen Expressionsrate in untersuchten Zellen eines CCC, machen dazu jedoch keine genaueren prozentualen Angaben (Ehling und Tacke 2015). Somit ist diese Arbeit ebenfalls eine der ersten, die Anhaltspunkte bezüglich der prozentualen Expressionsrate des CXCR4 in CCCs liefert.

6.4 Rezeptorexpression in den Tumorgefäßen

Nebenbefundlich zeigte sich bei der mikroskopischen Auswertung der Tumorschnitte eine ausgeprägte Expression des CXCR4 in den Tumorgefäßen. Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit ausgeführt, stehen Chemokine im Verdacht, die Neoangiogenese in den Tumoren zu fördern. So zeigten Studien an histologischen Schnitten von Glioblastomen eine erhöhte CXCR4-Expression in den neu gebildeten Gefäßen innerhalb der Tumore (Salcedo und Oppenheim 2003, Rempel et al. 2000). Auch in Pankreaskarzinomen konnte eine vermehrte gefäßbezogene Expression des CXCR4 nachgewiesen werden (Koshiba et al. 2000). Diese wurde jedoch eher bei größeren Blutgefäßen beobachtet, als für die Mikrovaskularisation. Die Studiengruppe vermutet daher einen Zusammenhang zwischen der CXCR4-Expression und dem Tumorwachstum im Sinne eines vermehrten Remodelings größerer Tumorgefäße (Salcedo und Oppenheim 2003). Diese Vermutung konnte durch eine Studie von Ingold et al. (2010) bestätigt werden. In dieser wurde eine CXCR4-Expression in Tumorgefäßen von Magenkarzinomen beobachtet. Des Weiteren fand sich ein Zusammenhang zwischen der vaskulären CXCR4-Expression und den klinischen Daten. Sowohl Magenkarzinome vom intestinalen als auch vom diffusen Typ zeigten hochsignifikante Korrelationen zwischen einer positiven CXCR4-Expression in den zugehörigen Tumorgefäßen und höheren UICC-Stadien sowie vermehrtem lokalem Tumorwachstum. Außerdem war auffällig, dass eine vaskuläre CXCR4-Expression vor allem in Tumorproben von Patienten mit einem jüngeren Erkrankungsalter (≤ 65 Jahre) auftrat. Allerdings hatte die CXCR4-Expression keine Auswirkung auf das Überleben der Patienten (Ingold et al. 2010). Ähnliche Angaben sind in der Literatur auch für das kolorektale Karzinom zu finden. Hier zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen vaskulärer CXCR4-Expression und einem höheren TNM-Stadium (Ingold et al. 2009).

Mit der vorliegenden Arbeit lässt sich nun ein ähnlicher Einfluss der vaskulären CXCR4-Expression auf das Tumorwachstum von HCCs und CCCs vermuten. Zwar gab es keine statistisch signifikanten Korrelationen zwischen der CXCR4-Positivität der Gefäße und den klinischen Daten (lediglich Tendenzen bezüglich eines erhöhten Serum-AFPs und eines erhöhten Ki-67-Indexes), allerdings zeigte sich im Gegensatz zur Studie von Ingold et al. (2010) ein erheblicher Einfluss der Präsenz des CXCR4 in den Tumorgefäßen auf das mediane Überleben der Patienten. Somit stellt die vaskuläre CXCR4-Expression einen neuen interessanten Ansatzpunkt für die Erforschung neuer Therapiestrategien für HCC- und CCC-Patienten dar.

7. Schlussfolgerungen

Die Expression von Somatostatin- und Chemokinrezeptoren in den verschiedensten Tumorentitäten geben aufgrund widersprüchlicher Studienergebnisse immer wieder Anlass für Diskussionen. Die vorliegende Arbeit gibt einen Überblick über die Expression der Somatostatin-Rezeptoren SSTR1 - SSTR5 sowie des Chemokinrezeptors CXCR4 in Tumorproben von Patienten mit einem hepatozellulären oder cholangiozellulären Karzinom.

Für die SSTR-Expression zeigten sich in den HCC-Präparaten insgesamt sehr geringe Expressionsraten mit zumeist auch niedrigen IRS-Scores. Dieses Ergebnis verstärkt zum einen die Vermutung, dass Unterschiede im SSTR-Besatz von HCCs in Abhängigkeit von der Ätiologie und der Ethnizität bestehen und zum anderen die Zweifel, ob eine SSA-Therapie ohne vorherige Bestimmung der SSTR-Expression in den westlichen Ländern sinnvoll ist. Für die SSTR-Expression in CCCs ergibt sich ein anderes Bild. Obwohl die Expression des SSTR2 (und somit die hauptsächliche Bindungsstelle von Octreotid) mit 27,3% der Fälle auch eher gering ist, lässt der mit 72,7% positiven Tumoren am häufigsten exprimierte Rezeptor SSTR1 die Vermutung zu, dass Pasireotid ein vielversprechender Ansatzpunkt für die weitere Erforschung der Wirksamkeit von SSA auch in CCCs sein könnte. Da dies jedoch die erste Arbeit ist, die quantitative Angaben zur Expression der einzelnen SSTRs in CCCs macht und die Zahl der untersuchten Patienten mit $n = 11$ recht gering ist, sollte dieses Ergebnis in künftigen Studien mit höheren Fallzahlen zunächst bestätigt werden.

Auch für die CXCR4-Expression zeigten sich in den CCC-Präparaten mit 63,6% positiven Tumoren höhere Expressionsraten als in den HCC-Präparaten mit 38,9% der Fälle. Zusätzlich konnte in beiden Tumorentitäten eine deutliche CXCR4-Expression in den zugehörigen Tumorgefäßen verzeichnet werden. Die vaskuläre Expression des Rezeptors konnte in 53,3% der HCC- und in 70% der CCC-Präparate unabhängig von der Anfärbung der Tumorzellen beobachtet werden. Zudem wiesen die HCC-Patienten mit CXCR4-Expression der Tumorgefäße ein statistisch signifikant geringeres medianes Überleben auf als solche mit einer CXCR4-Negativität. Eine ähnliche Tendenz zeigte sich auch bei den Patienten mit einem CCC, allerdings ohne statistische Signifikanz. Somit stellt der CXCR4 einen interessanten Ansatzpunkt zur Entwicklung von Therapieoptionen für beide Tumorentitäten dar. Insbesondere der vaskulären CXCR4-Expression sollte eine entscheidende Bedeutung in zukünftigen Studien beigemessen werden.

8. Literaturverzeichnis

- Abdel-Rahman O, Lamarca A, Valle JW, Hubner RA. 2014. Somatostatin receptor expression in hepatocellular carcinoma: prognostic and therapeutic considerations. *Endocr Relat Cancer*, 21 (6):R485-493.
- Auernhammer CJ, Spitzweg C, Heinemann V, Goke B. 2012. [Medicinal therapy of metastasized neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system.]. *Internist (Berl)*, 53:167-176.
- Balkwill FR. 2012. The chemokine system and cancer. *J Pathol*, 226 (2):148-157.
- Balogh J, Victor D, 3rd, Asham EH, Burroughs SG, Boktour M, Saharia A, Li X, Ghobrial RM, Monsour HP, Jr. 2016. Hepatocellular carcinoma: a review. *J Hepatocell Carcinoma*, 3:41-53.
- Barbare JC, Bouche O, Bonnetain F, Dahan L, Lombard-Bohas C, Faroux R, Raoul JL, Cattan S, Lemoine A, Blanc JF, Bronowicki JP, Zarski JP, Cazorla S, Gargot D, Thevenot T, Diaz E, Bastie A, Aparicio T, Bedenne L. 2009. Treatment of advanced hepatocellular carcinoma with long-acting octreotide: a phase III multicentre, randomised, double blind placebo-controlled study. *Eur J Cancer*, 45 (10):1788-1797.
- Barbieri F, Bajetto A, Pattarozzi A, Gatti M, Wurth R, Thellung S, Corsaro A, Villa V, Nizzari M, Florio T. 2013. Peptide receptor targeting in cancer: the somatostatin paradigm. *Int J Pept*, 2013:926295.
- Barnett P. 2003. Somatostatin and somatostatin receptor physiology. *Endocrine*, 20 (3):255-264.
- Becker G, Allgaier HP, Olschewski M, Zahringer A, Blum HE, Group HS. 2007. Long-acting octreotide versus placebo for treatment of advanced HCC: a randomized controlled double-blind study. *Hepatology*, 45 (1):9-15.
- Benoit R, Esch F, Bennett HP, Ling N, Ravazzola M, Orci L, Mufson EJ. 1990. Processing of prosomatostatin. *Metabolism*, 39 (9 Suppl 2):22-25.
- Bismuth H, Corlette MB. 1975. Intrahepatic cholangioenteric anastomosis in carcinoma of the hilus of the liver. *Surg Gynecol Obstet*, 140 (2):170-178.
- Blaker M, Schmitz M, Gocht A, Burghardt S, Schulz M, Broring DC, Pace A, Greten H, De Weerth A. 2004. Differential expression of somatostatin receptor subtypes in hepatocellular carcinomas. *J Hepatol*, 41 (1):112-118.
- Borbath I, Lhommel R, Guiot Y, Coche E, Sempoux C. 2012. Lanreotide treatment of metastatic hepatocellular carcinoma resulting in partial regression and more than 3 years of progression-free survival. *Acta Gastroenterol Belg*, 75 (2):270-273.
- Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R. 1973. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science*, 179 (4068):77-79.
- Campana D, Capurso G, Partelli S, Nori F, Panzuto F, Tamburrino D, Cacciari G, Delle Fave G, Falconi M, Tomassetti P. 2013. Radiolabelled somatostatin analogue treatment in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours: factors associated with response and suggestions for therapeutic sequence. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 40 (8):1197-1205.
- Chen X, Liu Z, Ai Z. 2001. Antineoplastic mechanism of Octreotide action in human hepatoma. *Chin Med J (Engl)*, 114 (11):1167-1170.
- Chensue SW. 2001. Molecular machinations: chemokine signals in host-pathogen interactions. *Clin Microbiol Rev*, 14 (4):821-835.
- Child CG, Turcotte JG. 1964. Surgery and portal hypertension. *Major Probl Clin Surg*, 1:1-85.

- Chou CK, Ho LT, Ting LP, Hu CP, Su TS, Chang WC, Suen CS, Huang MY, Chang CM. 1987. Selective suppression of insulin-induced proliferation of cultured human hepatoma cells by somatostatin. *J Clin Invest*, 79 (1):175-178.
- Chuang SC, La Vecchia C, Boffetta P. 2009. Liver cancer: descriptive epidemiology and risk factors other than HBV and HCV infection. *Cancer Lett*, 286 (1):9-14.
- Cui S, Hano H, Sakata A, Harada T, Liu T, Takai S, Ushigome S. 1996. Enhanced CD34 expression of sinusoid-like vascular endothelial cells in hepatocellular carcinoma. *Pathol Int*, 46 (10):751-756.
- de Lope CR, Tremosini S, Forner A, Reig M, Bruix J. 2012. Management of HCC. *J Hepatol*, 56:S75-S87.
- Dimitroulopoulos D, Xinopoulos D, Tsamakidis K, Zisimopoulos A, Andriotis E, Markidou S, Panagiotakos D, Chrysohoou C, Bazinis A, Paraskevas E. 2002. The role of sandostatin LAR in treating patients with advanced hepatocellular cancer. *Hepatogastroenterology*, 49 (47):1245-1250.
- Dizeyi N, Konrad L, Bjartell A, Wu H, Gadaleanu V, Hansson J, Helboe L, Abrahamsson PA. 2002. Localization and mRNA expression of somatostatin receptor subtypes in human prostatic tissue and prostate cancer cell lines. *Urol Oncol*, 7 (3):91-98.
- Duseja A. 2014. Staging of hepatocellular carcinoma. *J Clin Exp Hepatol*, 4 (Suppl 3):S74-79.
- Ehling J, Tacke F. 2015. Role of chemokine pathways in hepatobiliary cancer. *Cancer Lett*. 379(2): 173-183.
- El-Serag HB, Rudolph KL. 2007. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*, 132 (7):2557-2576.
- Fernandez EJ, Lolis E. 2002. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 42:469-499.
- Ferone D, Hofland LJ, Colao A, Lamberts SW, van Hagen PM. 2001a. Neuroendocrine aspects of immunolymphoproliferative diseases. *Ann Oncol*, 12 Suppl 2:S125-130.
- Ferone D, Kwekkeboom DJ, Pivonello R, Bogers AA, Lamberts SW, van Hagen PM, Hofland LJ. 2001b. In vivo and in vitro expression of somatostatin receptors in two human thymomas with similar clinical presentation and different histological features. *J Endocrinol Invest*, 24 (7):522-528.
- Fischer T, Doll C, Jacobs S, Kolodziej A, Stumm R, Schulz S. 2008. Reassessment of sst2 somatostatin receptor expression in human normal and neoplastic tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-1. *J Clin Endocrinol Metab*, 93 (11):4519-4524.
- Fisher WE, Wu Y, Amaya F, Berger DH. 2002. Somatostatin receptor subtype 2 gene therapy inhibits pancreatic cancer in vitro. *J Surg Res*, 105 (1):58-64.
- Gentilini A, Rombouts K, Galastri S, Caligiuri A, Mingarelli E, Mello T, Marra F, Mantero S, Roncalli M, Invernizzi P, Pinzani M. 2012. Role of the stromal-derived factor-1 (SDF-1)-CXCR4 axis in the interaction between hepatic stellate cells and cholangiocarcinoma. *J Hepatol*, 57 (4):813-820.
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. 1983. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*, 31 (1):13-20.
- Ghanem I, Riveiro ME, Paradis V, Faivre S, de Parga PM, Raymond E. 2014. Insights on the CXCL12-CXCR4 axis in hepatocellular carcinoma carcinogenesis. *Am J Transl Res*, 6 (4):340-352.
- Gobel T, Blondin D, Kolligs F, Bolke E, Erhardt A. 2013. [Current therapy of hepatocellular carcinoma with special consideration of new and multimodal treatment concepts]. *Dtsch Med Wochenschr*, 138 (27):1425-1430.
- Gomez D, Lobo DN. 2011. Malignant liver tumours. *Surgery (Oxford)*, 29 (12):632-639.

- Gomulkiewicz A, Podhorska-Okolow M, Szulc R, Smorag Z, Wojnar A, Zabel M, Dziegiel P. 2010. Correlation between metallothionein (MT) expression and selected prognostic factors in ductal breast cancers. *Folia Histochem Cytobiol*, 48 (2):242-248.
- Hall GH, Turnbull LW, Richmond I, Helboe L, Atkin SL. 2002. Localisation of somatostatin and somatostatin receptors in benign and malignant ovarian tumours. *Br J Cancer*, 87 (1):86-90.
- Haslinghuis LM, Krenning EP, De Herder WW, Reijts AE, Kwekkeboom DJ. 2001. Somatostatin receptor scintigraphy in the follow-up of patients with differentiated thyroid cancer. *J Endocrinol Invest*, 24 (6):415-422.
- Hua YP, Huang JF, Liang LJ, Li SQ, Lai JM, Liang HZ. 2005. [The study of inhibition effect of octreotide on the growth of hepatocellular carcinoma xenografts in situ in nude mice]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*, 43 (11):721-725.
- Huang F, Geng XP. 2010. Chemokines and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 16 (15):1832-1836.
- Ingold B, Schulz S, Budczies J, Neumann U, Ebert MP, Weichert W, Rocken C. 2009. The role of vascular CXCR4 expression in colorectal carcinoma. *Histopathology*, 55 (5):576-586.
- Ingold B, Simon E, Ungethüm U, Kuban RJ, Müller BM, Lupp A, Neumann U, Ebert MP, Denkert C, Weichert W, Schulz S, Rocken C. 2010. Vascular CXCR4 expression - a novel antiangiogenic target in gastric cancer? *PLoS One*, 5 (4):e10087.
- Ji XQ, Ruan XJ, Chen H, Chen G, Li SY, Yu B. 2011. Somatostatin analogues in advanced hepatocellular carcinoma: an updated systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Med Sci Monit*, 17 (8):RA169-176.
- Jia W, Feng K, Fan P, Fan G, Yang S, Zhang T, Wei Q, Qian L. 2012. Post-TACE combination therapy of heparin and octreotide results in decreased tumor metastasis in extrahepatic tumorigenesis. *Cell Biochem Biophys*, 62 (1):35-40.
- Jia WD, Xu GL, Wang W, Wang ZH, Li JS, Ma JL, Ren WH, Ge YS, Yu JH, Liu WB. 2009. A somatostatin analogue, octreotide, inhibits the occurrence of second primary tumors and lung metastasis after resection of hepatocellular carcinoma in mice. *Tohoku J Exp Med*, 218 (2):155-160.
- Kaemmerer D, Lupp A, Peter L, Fischer E, Schulz S, Kloppel G, Hommann M. 2013. Correlation of monoclonal and polyclonal somatostatin receptor 5 antibodies in pancreatic neuroendocrine tumors. *Int J Clin Exp Pathol*, 6 (1):49-54.
- Khan MU, Morse M, Coleman RE. 2008. Radioiodinated metaiodobenzylguanidine in the diagnosis and therapy of carcinoid tumors. *Q J Nucl Med Mol Imaging*, 52 (4):441-454.
- Khan SA, Davidson BR, Goldin RD, Heaton N, Karani J, Pereira SP, Rosenberg WM, Tait P, Taylor-Robinson SD, Thillainayagam AV, Thomas HC, Wasan H, British Society of G. 2012. Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: an update. *Gut*, 61 (12):1657-1669.
- Kimura H, Nakajima T, Kagawa K, Deguchi T, Kakusui M, Katagishi T, Okanoue T, Kashima K, Ashihara T. 1998. Angiogenesis in hepatocellular carcinoma as evaluated by CD34 immunohistochemistry. *Liver*, 18 (1):14-19.
- Knudsen ES, Gopal P, Singal AG. 2014. The changing landscape of hepatocellular carcinoma: etiology, genetics, and therapy. *Am J Pathol*, 184 (3):574-583.
- Koc EU, Ozgur T, Yerci O, Gurel S. 2013. Somatostatin receptor 1 (SSTR1) and somatostatin receptor 5 (SSTR5) expression in hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology*, 60 (127):1693-1697.
- Koshiba T, Hosotani R, Miyamoto Y, Ida J, Tsuji S, Nakajima S, Kawaguchi M, Kobayashi H, Doi R, Hori T, Fujii N, Imamura M. 2000. Expression of stromal cell-derived

- factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression. *Clin Cancer Res*, 6 (9):3530-3535.
- Krulich L, Dhariwal AP, McCann SM. 1968. Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro. *Endocrinology*, 83 (4):783-790.
- Kudo M, Trevisani F, Abou-Alfa GK, Rimassa L. 2016. Hepatocellular carcinoma: therapeutic guidelines and medical treatment. *Liver Cancer*, 6 (1):16-26.
- Kulaksiz H, Eissele R, Rossler D, Schulz S, Holtt V, Cetin Y, Arnold R. 2002. Identification of somatostatin receptor subtypes 1, 2A, 3, and 5 in neuroendocrine tumours with subtype specific antibodies. *Gut*, 50 (1):52-60.
- Lamberts SW, van der Lely AJ, de Herder WW, Hofland LJ. 1996. Octreotide. *N Engl J Med*, 334 (4):246-254.
- Lastoria S, Vergara E, Palmieri G, Acampa W, Varrella P, Caraco C, Bianco RA, Muto P, Salvatore M. 1998. In vivo detection of malignant thymic masses by indium-111-DTPA-D-Phe1-octreotide scintigraphy. *J Nucl Med*, 39 (4):634-639.
- Laws SA, Gough AC, Evans AA, Bains MA, Primrose JN. 1997. Somatostatin receptor subtype mRNA expression in human colorectal cancer and normal colonic mucosae. *Br J Cancer*, 75 (3):360-366.
- Li LT, Jiang G, Chen Q, Zheng JN. 2015. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). *Mol Med Rep*, 11 (3):1566-1572.
- Li M, Fisher WE, Kim HJ, Wang X, Brunicardi CF, Chen C, Yao Q. 2005. Somatostatin, somatostatin receptors, and pancreatic cancer. *World J Surg*, 29 (3):293-296.
- Li W, Gomez E, Zhang Z. 2007. Immunohistochemical expression of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) and CXCR4 ligand receptor system in hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*, 26 (4):527-533.
- Liang CM, Chen L, Hu H, Ma HY, Gao LL, Qin J, Zhong CP. 2015. Chemokines and their receptors play important roles in the development of hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol*, 7 (10):1390-1402.
- Liu H, Pan Z, Li A, Fu S, Lei Y, Sun H, Wu M, Zhou W. 2008. Roles of chemokine receptor 4 (CXCR4) and chemokine ligand 12 (CXCL12) in metastasis of hepatocellular carcinoma cells. *Cell Mol Immunol*, 5 (5):373-378.
- Liu HL, Huo L, Wang L. 2004. Octreotide inhibits proliferation and induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells. *Acta Pharmacol Sin*, 25 (10):1380-1386.
- Liu Y, Jiang L, Mu Y. 2013. Somatostatin receptor subtypes 2 and 5 are associated with better survival in operable hepatitis B-related hepatocellular carcinoma following octreotide long-acting release treatment. *Oncol Lett*, 6 (3):821-828.
- Lombardi L, Tavano F, Morelli F, Latiano TP, Di Sebastiano P, Maiello E. 2013. Chemokine receptor CXCR4: role in gastrointestinal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 88 (3):696-705.
- Lugtenburg PJ, Krenning EP, Valkema R, Oei HY, Lamberts SW, Eijkemans MJ, van Putten WL, Lowenberg B. 2001. Somatostatin receptor scintigraphy useful in stage I-II Hodgkin's disease: more extended disease identified. *Br J Haematol*, 112 (4):936-944.
- Luo Y, Ren F, Liu Y, Shi Z, Tan Z, Xiong H, Dang Y, Chen G. 2015. Clinicopathological and prognostic significance of high Ki-67 labeling index in hepatocellular carcinoma patients: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*, 8 (7):10235-10247.
- Moser B, Willmann K. 2004. Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Ann Rheum Dis*, 63 Suppl 2:ii84-ii89.
- Neubauer E, Wirtz RM, Kaemmerer D, Athellogou M, Schmidt L, Sanger J, Lupp A. 2016. Comparative evaluation of three proliferation markers, Ki-67, TOP2A, and RacGAP1, in bronchopulmonary neuroendocrine neoplasms: Issues and prospects. *Oncotarget*, 7 (27):41959-41973.

- Nomiyama H, Osada N, Yoshie O. 2011. A family tree of vertebrate chemokine receptors for a unified nomenclature. *Dev Comp Immunol*, 35 (7):705-715.
- Olias G, Viollet C, Kusserow H, Epelbaum J, Meyerhof W. 2004. Regulation and function of somatostatin receptors. *J Neurochem*, 89 (5):1057-1091.
- Papotti M, Macri L, Bussolati G, Reubi JC. 1989. Correlative study on neuro-endocrine differentiation and presence of somatostatin receptors in breast carcinomas. *Int J Cancer*, 43 (3):365-369.
- Papotti M, Croce S, Macri L, Funaro A, Pecchioni C, Schindler M, Bussolati G. 2000. Correlative immunohistochemical and reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis of somatostatin receptor type 2 in neuroendocrine tumors of the lung. *Diagn Mol Pathol*, 9 (1):47-57.
- Papotti M, Kumar U, Volante M, Pecchioni C, Patel YC. 2001a. Immunohistochemical detection of somatostatin receptor types 1-5 in medullary carcinoma of the thyroid. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 54 (5):641-649.
- Papotti M, Croce S, Bello M, Bongiovanni M, Allia E, Schindler M, Bussolati G. 2001b. Expression of somatostatin receptor types 2, 3 and 5 in biopsies and surgical specimens of human lung tumours. Correlation with preoperative octreotide scintigraphy. *Virchows Arch*, 439 (6):787-797.
- Papotti M, Bongiovanni M, Volante M, Allia E, Landolfi S, Helboe L, Schindler M, Cole SL, Bussolati G. 2002. Expression of somatostatin receptor types 1-5 in 81 cases of gastrointestinal and pancreatic endocrine tumors. A correlative immunohistochemical and reverse-transcriptase polymerase chain reaction analysis. *Virchows Arch*, 440 (5):461-475.
- Patel YC. 1997. Molecular pharmacology of somatostatin receptor subtypes. *J Endocrinol Invest*, 20 (6):348-367.
- Patel YC, Srikant CB. 1997. Somatostatin receptors. *Trends Endocrinol Metab*, 8 (10):398-405.
- Pelletier G, Dube D, Puviani R. 1977. Somatostatin: electron microscope immunohistochemical localization in secretory neurons of rat hypothalamus. *Science*, 196 (4297):1469-1470.
- Pilichowska M, Kimura N, Schindler M, Kobari M. 2001. Somatostatin type 2A receptor immunoreactivity in human pancreatic adenocarcinomas. *Endocr Pathol*, 12 (2):147-155.
- Prete SD, Montella L, Caraglia M, Maiorino L, Cennamo G, Montesarchio V, Piai G, Febbraro A, Tarantino L, Capasso E, Palmieri G, Guarrasi R, Bianco M, Mamone R, Savastano C, Pisano A, Vincenzi B, Sabia A, D'Agostino A, Faiola V, Addeo R. 2010. Sorafenib plus octreotide is an effective and safe treatment in advanced hepatocellular carcinoma: multicenter phase II So.LAR. study. *Cancer Chemother Pharmacol*, 66 (5):837-844.
- Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. 1973. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg*, 60 (8):646-649.
- Pyronnet S, Bousquet C, Najib S, Azar R, Laklai H, Susini C. 2008. Antitumor effects of somatostatin. *Mol Cell Endocrinol*, 286 (1-2):230-237.
- Qiu CZ, Wang C, Huang ZX, Zhu SZ, Wu YY, Qiu JL. 2006. Relationship between somatostatin receptor subtype expression and clinicopathology, Ki-67, Bcl-2 and p53 in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 12 (13):2011-2015.
- Rauly I, Saint-Laurent N, Delesque N, Buscail L, Esteve JP, Vaysse N, Susini C. 1996. Induction of a negative autocrine loop by expression of sst2 somatostatin receptor in NIH 3T3 cells. *J Clin Invest*, 97 (8):1874-1883.
- Razumilava N, Gores GJ. 2014. Cholangiocarcinoma. *Lancet*, 383 (9935):2168-2179.

- Remmele W, Stegner HE. 1987. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe*, 8 (3):138-140.
- Rempel SA, Dudas S, Ge S, Gutierrez JA. 2000. Identification and localization of the cytokine SDF1 and its receptor, CXC chemokine receptor 4, to regions of necrosis and angiogenesis in human glioblastoma. *Clin Cancer Res*, 6 (1):102-111.
- Reubi JC, Krenning E, Lamberts SW, Kvols L. 1992a. In vitro detection of somatostatin receptors in human tumors. *Metabolism*, 41 (9 Suppl 2):104-110.
- Reubi JC, Laissue J, Krenning E, Lamberts SW. 1992b. Somatostatin receptors in human cancer: incidence, characteristics, functional correlates and clinical implications. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 43 (1-3):27-35.
- Reubi JC, Laissue J, Waser B, Horisberger U, Schaer JC. 1994. Expression of somatostatin receptors in normal, inflamed, and neoplastic human gastrointestinal tissues. *Ann N Y Acad Sci*, 733:122-137.
- Reubi JC, Waser B, Schaer JC, Markwalder R. 1995. Somatostatin receptors in human prostate and prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab*, 80 (9):2806-2814.
- Reubi JC, Schaer JC, Laissue JA, Waser B. 1996. Somatostatin receptors and their subtypes in human tumors and in peritumoral vessels. *Metabolism*, 45 (8 Suppl 1):39-41.
- Reubi JC, Zimmermann A, Jonas S, Waser B, Neuhaus P, Laderach U, Wiedenmann B. 1999. Regulatory peptide receptors in human hepatocellular carcinomas. *Gut*, 45 (5):766-774.
- Reubi C, Gugger M, Waser B. 2002. Co-expressed peptide receptors in breast cancer as a molecular basis for in vivo multireceptor tumour targeting. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 29 (7):855-862.
- Reynaert H, Rombouts K, Vandermonde A, Urbain D, Kumar U, Bioulac-Sage P, Pinzani M, Rosenbaum J, Geerts A. 2004. Expression of somatostatin receptors in normal and cirrhotic human liver and in hepatocellular carcinoma. *Gut*, 53 (8):1180-1189.
- Rizvi S, Gores GJ. 2013. Pathogenesis, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma. *Gastroenterology*, 145 (6):1215-1229.
- Rubie C, Frick VO, Wagner M, Weber C, Kruse B, Kempf K, Konig J, Rau B, Schilling M. 2006. Chemokine expression in hepatocellular carcinoma versus colorectal liver metastases. *World J Gastroenterol*, 12 (41):6627-6633.
- Salcedo R, Oppenheim JJ. 2003. Role of chemokines in angiogenesis: CXCL12/SDF-1 and CXCR4 interaction, a key regulator of endothelial cell responses. *Microcirculation*, 10 (3-4):359-370.
- Samonakis DN, Notas G, Christodoulakis N, Kouroumalis EA. 2008. Mechanisms of action and resistance of somatostatin analogues for the treatment of hepatocellular carcinoma: a message not well taken. *Dig Dis Sci*, 53 (9):2359-2365.
- Scarpignato C, Pelosini I. 2001. Somatostatin analogs for cancer treatment and diagnosis: an overview. *Chemotherapy*, 47 Suppl 2:1-29.
- Schimanski CC, Bahre R, Gockel I, Muller A, Frerichs K, Horner V, Teufel A, Simiantonaki N, Biesterfeld S, Wehler T, Schuler M, Achenbach T, Junginger T, Galle PR, Moehler M. 2006. Dissemination of hepatocellular carcinoma is mediated via chemokine receptor CXCR4. *Br J Cancer*, 95 (2):210-217.
- Schmid HA. 2008. Pasireotide (SOM230): development, mechanism of action and potential applications. *Mol Cell Endocrinol*, 286 (1-2):69-74.
- Scholzen T, Gerdes J. 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 182 (3):311-322.
- Sestini R, Orlando C, Peri A, Tricarico C, Pazzagli M, Serio M, Pagani A, Bussolati G, Granchi S, Maggi M. 1996. Quantitation of somatostatin receptor type 2 gene

- expression in neuroblastoma cell lines and primary tumors using competitive reverse transcription-polymerase chain reaction. *Clin Cancer Res*, 2 (10):1757-1765.
- Soares KC, Kamel I, Cosgrove DP, Herman JM, Pawlik TM. 2014. Hilar cholangiocarcinoma: diagnosis, treatment options, and management. *Hepatobiliary Surg Nutr*, 3 (1):18-34.
- Surowiak P, Materna V, Matkowski R, Szczuraszek K, Kornafel J, Wojnar A, Pudelko M, Dietel M, Denkert C, Zabel M, Lage H. 2005. Relationship between the expression of cyclooxygenase 2 and MDR1/P-glycoprotein in invasive breast cancers and their prognostic significance. *Breast Cancer Res*, 7 (5):R862-870.
- Sutton A, Friand V, Brule-Donneger S, Chaigneau T, Ziol M, Sainte-Catherine O, Poire A, Saffar L, Kraemer M, Vassy J, Nahon P, Salzmann JL, Gattegno L, Charnaux N. 2007. Stromal cell-derived factor-1/chemokine (C-X-C motif) ligand 12 stimulates human hepatoma cell growth, migration, and invasion. *Mol Cancer Res*, 5 (1):21-33.
- Taboada GF, Luque RM, Bastos W, Guimaraes RF, Marcondes JB, Chimelli LM, Fontes R, Mata PJ, Filho PN, Carvalho DP, Kineman RD, Gadelha MR. 2007. Quantitative analysis of somatostatin receptor subtype (SSTR1-5) gene expression levels in somatotropinomas and non-functioning pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol*, 156 (1):65-74.
- Teicher BA, Fricker SP. 2010. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*, 16 (11):2927-2931.
- Ueberberg B, Tourne H, Redmann A, Walz MK, Schmid KW, Mann K, Petersenn S. 2005. Differential expression of the human somatostatin receptor subtypes sst1 to sst5 in various adrenal tumors and normal adrenal gland. *Horm Metab Res*, 37 (12):722-728.
- Valero V, 3rd, Cosgrove D, Herman JM, Pawlik TM. 2012. Management of perihilar cholangiocarcinoma in the era of multimodal therapy. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 6 (4):481-495.
- Verhoef C, van Dekken H, Hofland LJ, Zondervan PE, de Wilt JH, van Marion R, de Man RA, JN IJ, van Eijck CH. 2008. Somatostatin receptor in human hepatocellular carcinomas: biological, patient and tumor characteristics. *Dig Surg*, 25 (1):21-26.
- Verset G, Verslype C, Reynaert H, Borbath I, Langlet P, Vandebroek A, Peeters M, Houbiers G, Francque S, Arvanitakis M, Van Laethem JL. 2007. Efficacy of the combination of long-acting release octreotide and tamoxifen in patients with advanced hepatocellular carcinoma: a randomised multicentre phase III study. *Br J Cancer*, 97 (5):582-588.
- Vikic-Topic S, Raisch KP, Kvols LK, Vuk-Pavlovic S. 1995. Expression of somatostatin receptor subtypes in breast carcinoma, carcinoid tumor, and renal cell carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 80 (10):2974-2979.
- Vilar E, Salazar R, Perez-Garcia J, Cortes J, Oberg K, Tabernero J. 2007. Chemotherapy and role of the proliferation marker Ki-67 in digestive neuroendocrine tumors. *Endocr Relat Cancer*, 14 (2):221-232.
- Volante M, Rosas R, Allia E, Granata R, Baragli A, Muccioli G, Papotti M. 2008. Somatostatin, cortistatin and their receptors in tumours. *Mol Cell Endocrinol*, 286 (1-2):219-229.
- Wong D, Korz W. 2008. Translating an antagonist of chemokine receptor CXCR4: from bench to bedside. *Clin Cancer Res*, 14 (24):7975-7980.
- Yao D, Kunam VK, Li X. 2014. A review of the clinical diagnosis and therapy of cholangiocarcinoma. *J Int Med Res*, 42 (1):3-16.
- Yuen MF, Poon RT, Lai CL, Fan ST, Lo CM, Wong KW, Wong WM, Wong BC. 2002. A randomized placebo-controlled study of long-acting octreotide for the treatment of advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 36 (3):687-691.
- Zamora V, Cabanne A, Salanova R, Bestani C, Domenichini E, Marmissolle F, Giacomi N, O'Connor J, Mendez G, Roca E, Buenos A, La Plata Argentina Argentum Working G.

2010. Immunohistochemical expression of somatostatin receptors in digestive endocrine tumours. *Dig Liver Dis*, 42 (3):220-225.
- Zhao B, Zhao H, Zhao N, Zhu XG. 2002. Cholangiocarcinoma cells express somatostatin receptor subtype 2 and respond to octreotide treatment. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 9 (4):497-502.
- Zlotnik A, Yoshie O. 2012. The chemokine superfamily revisited. *Immunity*, 36 (5):705-716.

9. Anhang

9.1 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau apl. Prof. Dr. Amelie Lupp, Herr PD Dr. Daniel Kämmerer, Frau Dipl.-Pharm. Elisa Neubauer,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Kreischa, 22.03.2017

9.2 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau apl. Prof. Dr. med. Amelie Lupp für die herausragende fachliche Betreuung, das sehr angenehme Arbeitsklima sowie die allzeit vorhandene Unterstützung, unermüdliche Geduld und das offene Ohr für Fragen zu jeder Tageszeit. Ihre motivierende und herzliche Art hat einen großen Teil zur erfolgreichen Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen.

Des Weiteren möchte ich Herrn PD Dr. Daniel Kämmerer, der den Grundstein dieser Dissertation gelegt hat, meinen Dank für die großartige Zusammenarbeit, die fachkundigen Ratschläge, vor allem im klinischen Bereich sowie für die jederzeit vorhandene Hilfsbereitschaft ausdrücken.

Ein großes Dankeschön geht zudem an die Mitarbeiter des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie des Uniklinikums Jena, hierbei insbesondere an Frau Dipl.-Pharm. Elisa Neubauer, Franziska Zohles und Franziska Klingspor, für die Unterstützung bei der Durchführung der immunhistochemischen Färbungen.

Zudem möchte ich mich bei Herrn Dr. Jörg Sängler für die Bereitstellung der Tumorproben und die fachkundigen Ratschläge zur histologischen Auswertung der Präparate bedanken.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meiner Freundin, meiner Familie und meinen Freunden, die mir in allen Lebensbereichen immer wieder Kraft verleihen.